

Math. -Nat. Fakultät I
Institut für Biologie
Biochemie der Pflanzen
Invalidenstraße 42
Humboldt-Universität zu Berlin
10115 Berlin

Dissertation

**Untersuchungen zu Funktion und Struktur der
Cyanophycin-Synthetase von *Anabaena variabilis*
ATCC 29413**

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Chemiker Holger Berg

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau
2. PD Dr. Rainer Zocher
3. Prof. Dr. Elfriede Pistorius

eingereicht: 10.04.2003

Datum der Promotion: 11.07.2003

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	1
1.	Einleitung	3
1.1.	Cyanophycin – einleitende Bemerkungen	3
1.2.	Eigenschaften von Cyanophycin	4
1.3.	Cyanophycinmetabolismus	7
1.4.	Bedingungen für das Auftreten der Cyanophycin-Granula	8
1.4.1.	Cyanophycin-Akkumulation und Stickstoffhaushalt der Zelle	10
1.4.2.	Cyanophycin-Akkumulation und Akineten	12
1.4.3.	Cyanophycin-Akkumulation unter Stressbedingungen	12
1.4.4.	Andere mögliche Funktionen von Cyanophycin	13
1.5.	Übereinstimmende Merkmale der Organismen, die Cyanophycin synthetisieren	14
1.6.	Strategien der nichtribosomalen Peptidsynthese	15
1.7.	Die Cyanophycin-Synthetase	17
1.8.	Verbreitung der Cyanophycin-Synthetase	19
1.9.	Primärsequenz und strukturelle Merkmale der Cyanophycin-Synthetase	20
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Material	22
2.1.1.	Chemikalien	22
2.1.2.	Radiochemikalien	25
2.1.3.	Enzyme	25
2.1.4.	Säulen-Material	25
2.1.5.	Kits	26
2.1.6.	Nucleinsäuren	27
2.1.7.	Filter, Röntgenfilme, sonstiges Material	27
2.1.8.	Technische Geräte	27
2.1.9.	Biologisches Material	29
2.1.9.1.	Bakterienstämme	29
2.1.9.2.	Plasmide	29

2.2.	Methoden	29
2.2.1.	Anzuchtbedingungen, Zellernte und Zellaufbruch	29
2.2.1.1.	Anzuchtbedingungen	29
2.2.1.2.	Zellernte	30
2.2.1.3.	Zellaufbruch und Herstellung des Rohextraktes	30
2.2.2.	Reinigung der Proteine	31
2.2.2.1.	Reinigung des Wildtyp-Enzyms und der mutierten Cyanophycin-Synthetasen an Blue-Sepharose CL-6B	31
2.2.2.2.	Reinigung von Cyanophycin-Synthetase/His ₁₀ -tag-Fusionsproteinen an Ni-NTA-Agarose	32
2.2.2.3.	Trennung an Hi load Superdex-200	33
2.2.3.	Synthese verschiedener Peptide	33
2.2.3.1.	Synthese der Cyanophycinprimer	33
2.2.3.2.	Synthese von β -Asp-Arg	34
2.2.4.	Analytische Verfahren	34
2.2.4.1.	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.4.2.	Coomassie-Färbung	36
2.2.4.3.	Immunblot	36
2.2.4.4.	MALDI-TOF-Massenspektroskopie	37
2.2.4.5.	Quantitative Proteinbestimmung	38
2.2.5.	Biochemische Untersuchungen	38
2.2.5.1.	Reaktionsbedingungen für den Einbau von [³ H]-markierten Substraten	38
2.2.5.2.	Reaktionsbedingungen für die Produktanalyse über SDS-PAGE	39
2.2.5.3.	Bedingungen für die Produktanalyse mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie	40
2.2.5.4.	Bestimmung der Phosphorylierung von Cyanophycin durch die Cyanophycin-Synthetase	40
2.2.5.4.1.	Bestimmung der Phosphorylierung von Cyanophycin	40
2.2.5.4.2.	Bestimmung der Stabilität des gebildeten Phosphats	41
2.2.5.5.	Trennung von Reaktionsprodukten durch Größenausschluss-Chromatographie an einer P2-Säule und Nachweis der Kalibranden	42
2.2.6.	Gentechnische Arbeiten	43
2.2.6.1.	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43

2.2.6.2.	Agarosegelelektrophorese von DNA	43
2.2.6.3.	Elution von DNA aus Agarosegelen	43
2.2.6.4.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen	44
2.2.6.5.	Ligation von DNA-Fragmenten	44
2.2.6.6.	Transformation von <i>E. coli</i>	44
2.2.6.7.	Sequenzierungen	44
2.2.6.8.	Herstellung verschiedener <i>cphA</i> -Konstrukte	44
2.2.6.8.1.	Ortsgerichtete Mutagenesen	44
2.2.6.8.2.	Umklonierung von <i>cphA</i> in den Vektor pET-19b	45
2.2.6.8.3.	Konstruktion und Expression von separat exprimierten <i>cphA</i> -Bereichen	45
2.2.6.8.4.	Konstruktion einer Deletion im N-Bereich (ΔN)	46
2.2.6.8.5.	Konstruktion einer Deletion im C-Bereich (ΔC)	46
3.	Ergebnisse	47
3.1.	Fragestellung und Lösungsansätze	47
3.1.1.	<i>In vitro</i> -Synthese von Cyanophycin	47
3.2.	Versuche, die CphA-Anreicherung zu optimieren	48
3.3.	<i>In vitro</i> -Elongation mit Hilfe synthetischer Primer	48
3.4.	Test verschiedener Peptide als Aminosäuresubstrat bzw. Primer	50
3.5.	Abfolge des Einbaus der Aminosäuresubstrate	53
3.6.	Substratspezifität der Cyanophycin-Synthetase	55
3.7.	Struktur der Cyanophycin-Synthetase	57
3.8.	Komplementierungsversuche mit verschiedenen mutierten Synthetasen	61
3.8.1.	Deletionsmutanten und separat exprimierte Bereiche	62
3.9.	Mechanismus der Cyanophycin-Synthese	63
3.9.1.	Hypothese 1: Die α -Carboxylgruppe der Cyanophycin- präparation liegt immer phosphoryliert vor	66
3.9.2.	Hypothese 2: Der Anteil des „stumpfen“ Cyanophycins, d.h. des Cyanophycins ohne überhängenden Aspartatrest, ist relativ gering	66
3.9.3.	Hypothese 3: Cyanophycin-Synthetase katalysiert eine schnelle Dephosphorylierung des α -Acylphosphates	68

3.9.4.	Hypothese 4: Die Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe ist mechanistisch an die Bindung eines Aspartatrestes gekoppelt	69
4.	Diskussion	71
4.1.	Reaktionsmechanismus der Cyanophycinsynthetase	71
4.1.1.	Aktivität des C-Bereiches der Cyanophycinsynthetase	73
4.1.1.1.	Reihenfolge der Substratbindung durch den C-Bereich	73
4.1.1.2.	Aspartat verringert eine nachweisbare Phosphorylierung	74
4.1.2.	Aktivität des N-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase	75
4.1.2.1.	Möglicherweise ist der Anteil „stumpfen“ Cyanophycins gering	76
4.1.2.2.	Die Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe könnte mechanistisch an die Bindung eines Aspartatrestes gekoppelt sein	76
4.1.2.3.	Zusammenfassung der Experimente zur Phosphorylierung von Cyanophycin durch den N-Bereich der Cyanophycin-Synthetase	78
4.1.3.	Aktivitäten der Bereiche im Vergleich	78
4.2.	Komplementierungsversuche	79
4.3.	Alternative Teilstrukturen von Cyanophycin	81
4.3.1.	Diskussion der Abbildung 22B	82
4.3.2.	Diskussion der Abbildung 22C	83
4.3.3.	Diskussion der Abbildung 22D	83
4.4.	Löslichkeit und Struktur von Cyanophycin	83
4.5.	Keine <i>in vitro</i> -Cyanophycin-Synthese ohne Primer	85
4.6.	Diskussion der Substratspezifität	86
4.7.	Physiologische Bedeutung von Cyanophycin	87
5.	Literaturverzeichnis	89
6.	Anhang	99
6.1.	Berechnete mittlere Molmassen	99
6.2.	Dokumentation der MALDI-Massenspektren	100
6.2.1.	Erläuterung und Diskussion der MALDI-Massenspektren	103
6.2.1.1.	Allgemeines	103
6.2.1.2.	Erläuterung der Spektren	103
6.3.	Proteinsequenzvergleich	105

6.3.1.	Proteinsequenzvergleich zwischen CphA aus <i>A. variabilis</i> und aus anderen Cyanobakterien	105
6.3.2.	Proteinsequenzvergleich zwischen CphA aus <i>A. variabilis</i> und ähnlichen Sequenzen aus nichtcyanobakteriellen Bakterien	109
6.3.3.	Legende zu Sequenzvergleichen	111
6.4.	Verschiedene als Substrat untersuchte Verbindungen	112
6.5.	Publikationen	113
6.6.	Erklärung	114
6.7.	Lebenslauf	115
6.8.	Danksagung	116

„Es giebt wohl kaum ein Plasmagebilde höherer Pflanzen,
mit dem nicht schon die Cyanophycinkörner
für identisch erklärt worden sind“ (Hegler 1901).

"Diese Versuche ergaben, dass die Kristalloide
als typische Reservestoffe aufzufassen sind,..." (Hegler 1901)

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem bisher noch nicht untersuchten Mechanismus der Cyanophycinbiosynthese. Hierzu wurden verschiedene kurze Cyanophycinmoleküle chemisch synthetisiert, die als definierte Primer in *in vitro* Experimenten verwendet wurden. Die Verwendung dieser Primer ermöglichte erstmals die Richtung der Verlängerung des Cyanophycinmoleküls aufzuklären. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass der Einbau der konstituierenden Aminosäuren sukzessiv vom Carboxyterminus aus erfolgt. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch die nicht proteinogenen Aminosäuren Ornithin und Citrullin vom Enzym eingebaut werden. Mittels ortsgerichteter Mutagenese wurde zudem eine Zuordnung unterschiedlicher Abschnitte der Cyanophycin-Synthetase zu den verschiedenen vom Enzym katalysierten Teilreaktionen versucht. Mutationen im N-terminalen Bereich der Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 führten dazu, dass Aspartat nicht mehr in Cyanophycin eingebaut wurde, eine Mutation im C-terminalen Bereich bewirkte, dass Arginin nicht mehr mit Cyanophycin verknüpft werden konnte. Als Reaktionsmechanismus wird für die Bindung beider Aminosäuren jeweils eine Phosphorylierung des C-terminalen Aspartatrestes von Cyanophycin als Acylphosphat vorgeschlagen, wobei die Phosphorylierung der β -Carboxylgruppe mittels γ -[^{32}P]-ATP nachgewiesen werden konnte, die Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe jedoch nicht. Durch Vergleiche mit Enzymen ähnlicher Aminosäuresequenz und bekannter Raumstruktur wird eine mögliche Begründung für diese unterschiedlichen Befunde gegeben.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ahx	6-Aminohexansäure
All	Allylrest
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AS	Aminosäureposition in der Aminosäuresequenz
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	basepairs, Basenpaare
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
<i>t</i> Bu	tertiär-Butyl
cpm	counts per minute, Zählimpulse pro Minute
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz
ESI/EELS	electron spectroscopic imaging/electron energy loss spectroscopy
Fmoc	9-Fluoromethyloxycarbonyl
g	Erdbeschleunigung, $g=9,81 \text{ m/s}^2$
PCC	Pasteur Culture Collection
P _i	anorganisches Phosphat
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
MALDI-MS	matrix assisted laser desorption/ionization-Massenspektrometrie
MurC	UDP-N-Acetylmuramin:L-Alanin Ligase
MurD	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-alanin:D-Glutamat-Ligase
MurF	UDP-N-Acetylmuramoyl-tripeptid:D-Alanyl-D-alanin-Ligase
nt	Nucleotidposition in Nucleotidsequenz

NTA	Nitrilotriessigsäure
RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natrium-Laurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-Kochsalzpuffer für Immunblot
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-1,2-diaminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
TIBS	Triisobutylsilan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-TBS	Tris-Kochsalzpuffer (TBS) unter Zusatz von Tween-20
UDP	Uracil-5'-diphosphat
UMA	UDP-N-Acetylmuramoyl-L-alanin
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Cyanophycin – einleitende Bemerkungen

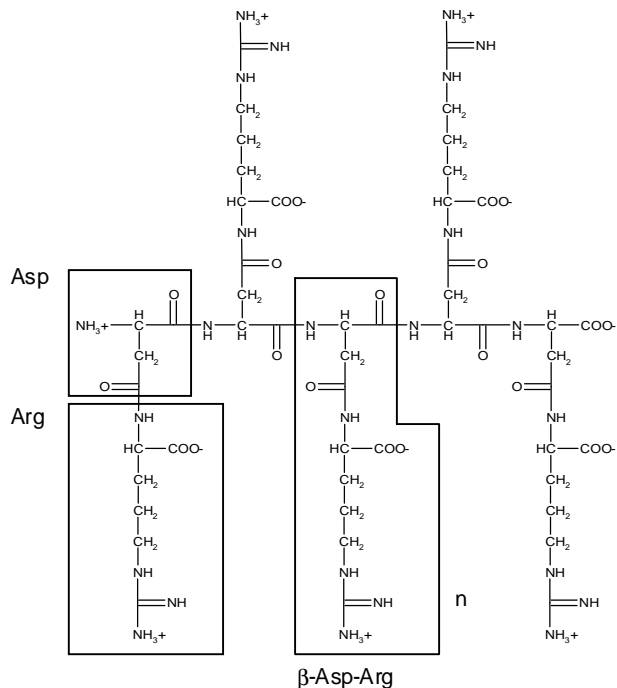
Cyanophycin ist ein nichtribosomal gebildetes Polypeptid (Simon 1973), das in Form von unlöslichen Granula im Cytoplasma von Cyanobakterien vorkommt (Abb. 1, Granula der mittleren Zelle mit „Cy“ gekennzeichnet).



Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Anabaena variabilis* ATCC 29413

Zellen angezogen in phosphatreduziertem Medium ($0,01 \text{ mM PO}_4^{3-}$), mit freundlicher Genehmigung von Dirk P. Stephan, Universität Bielefeld. Die dunklen Einschlüsse sind Cyanophycingranula.

1887 wurden diese Granula von Borzi erstmals beschrieben und das Wort „cianoficina“ geprägt. Simon isolierte 1970 als erster Cyanophycin, indem er die Löslichkeit in verdünnten Säuren, sowie die Unlöslichkeit bei neutralem pH-Wert ausnutzte. Dieses Polymer hat eine Molmasse zwischen 25 und 100 kDa. Es besteht aus einem Poly- α -Aspartat-Rückgrat, dessen β -Carboxylgruppen jeweils mit der α -Aminogruppe eines Argininrestes verbunden sind (Abb. 2, vorgeschlagen von Simon *et al.* 1976 & 1980, Hejazi 2002, Beschreibung der Eigenschaften in Abschnitt 1.2.).



Das Dipeptid β -Asp-Arg kann als Strukturelement von Cyanophycin aufgefasst werden.

n: Anzahl der β -Asp-Arg-Elemente
 $\approx 90 - 110$ bei Expression in *E. coli*
 $\approx 90 - 360$ in *Anabaena variabilis*

Abbildung 2: Struktur von Cyanophycin

1.2. Eigenschaften von Cyanophycin

Cyanobakterien können morphologisch grundsätzlich in zwei Formen unterteilt werden: Es gibt einzellige, coccale Organismen (z.B. *Synechocystis*, *Synechococcus*) oder solche, die fädig organisiert sind (z.B. *Nostoc*, *Anabaena*). Teilweise können sie sich aus regulären, d.h. vegetativen Zellen, zu spezialisierten Zelltypen differenzieren: Manche Arten bilden z.B. Dauerformen, sogenannte Akineten, für die Fixierung von Luftstickstoff spezialisierte Zellen, die Heterocysten (übersetzt: „andere“ Cysten) oder bewegliche Zellfäden (Hormogonien).

Als vorwiegend photoautotroph lebende Organismen kommen Cyanobakterien auf der Erde nahezu überall vor, wo Licht vorhanden ist. In Gewässern, vor allem den Ozeanen, produzierten sie vermutlich als erste Lebewesen den für viele heterotrophe Organismen lebenswichtigen Sauerstoff. Sie können in Symbiose mit und in Pflanzen, wie z.B. dem tropischen Wasserfarn *Azolla* oder z.B. als Flechte, d.h. in Symbiose mit einem Pilz, vorkommen. Viele Arten können Cyanophycin synthetisieren (siehe Abschnitt 1.8.). Cyanophycin-Akkumulation kann also in sehr unterschiedlichen Habitaten bzw. unter sehr unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auftreten.

Borzi (1887) hat die Eigenschaften der durch Lichtmikroskopie identifizierten Cyanophycin-Granula in den Blaualgenzellen wie folgt beschrieben: „Die Substanz der Körner ist homogen, nicht geschichtet; in H_2SO_4 , HCl , HNO_3 quellen die Körner auf und verschwinden. Ebenso quellen sie in KOH “ (zitiert nach Hegler, 1901).

Mittels Sakaguchi-Reagenz gelang der Nachweis eines hohen Arginingehalts (Fogg 1951). Robert Simon hat 1971 Cyanophycin aus *Anabaena cylindrica* durch differentielle Zentrifugation erstmalig isoliert und seine typische Aminosäure-Zusammensetzung, sowie seine Größenverteilung beschrieben. Es ist ein Copolymer, bestehend aus L-Aspartat und L-Arginin im Verhältnis 1:1 mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 100 kDa. Die von Simon vorgeschlagene Struktur eines verzweigten Peptides mit einem Poly- α -Aspartat als Rückgrat an dessen β -Carboxylgruppen jeweils Argininreste gebunden sind, hat sich bestätigt (Simon & Weathers 1976, Hejazi 2002, Obst *et al.* 2002). Cyanophycin aus *Anabaena cylindrica* besitzt zwei isoelektrische Punkte: Ca. 90% des Materials wird bei isoelektrischer Fokussierung in einem 6,0 M Harnstoffgel bei einem pH-Wert von 4,75 und der Rest bei einem pH-Wert von 6,10 gefunden (Simon & Weathers 1976).

Cyanophycin wird von der Cyanophycin-Synthetase gebildet, die in den meisten Cyanobakterien vorkommt (siehe Abschnitte 1.8.). Substrate der von der Cyanophycin-Synthetase katalysierten Reaktionen sind die Aminosäuren Aspartat und Arginin sowie ATP. Für die Aktivität der Cyanophycinsynthetase sind KCl , MgCl_2 , sowie ein Sufhydrylreagenz wie Mercaptoethanol oder Dithiothreitol notwendig (Simon 1976).

Es wurde mehrfach von einer abweichenden Aminosäurezusammensetzung berichtet: Glutamat wurde in Cyanophycin aus *Synechocystis* PCC 6308 und *Synechococcus* sp. strain G2.1 gefunden (Merritt *et al.* 1994, Wingard *et al.* 2002). Das Verhältnis von Aspartat und Arginin, bzw. Aspartat und basischer Aminosäure ist nach Hai *et al.* (1999, *Synechococcus* MA 19) 1:0,9, nach Frey *et al.* (2002, *Synechocystis* PCC 6803, heterolog exprimiert in *E. coli*) zwischen 1:0,79 und 1:0,93 sowie nach Stephan (2000, unter Phosphatlimitierung gewachsene *Synechocystis* PCC 6803) 1:1,3. In *E. coli* exprimierte Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* bildete Cyanophycin, das aus den Aminosäuren Aspartat, Arginin und Lysin im Verhältnis von 1 : 1,15 : 0,07 (Asp:Arg:Lys) bestand (Ziegler *et al.* 1998).

Ein höherer Anteil an Arginin, bzw. Arginin und Lysin im Vergleich zu Aspartat lässt sich nicht mit dem Modell des Cyanophycinmoleküls (Abb. 2) in

Einklang bringen. Zudem gibt es viele verschiedene Angaben über die Aminosäurezusammensetzung, die in verschiedenen Anzuchtbedingungen, Wachstumsphasen, artabhängigen Enzymvariabilitäten, sowie bei heterolog exprimierten Synthetasen in verschiedenen Wirtsorganismen und Anzuchtmedien begründet sein könnten. In der Anwendung verschiedener Cyanophycinextraktions- und Nachweisverfahren, sowie einer vermutlich stark unterschiedlichen Extrahierbarkeit verschieden aufgebauter oder verschieden gefalteter Cyanophycinmoleküle lassen sich weitere Ursachen für unterschiedliche Ergebnisse vermuten.

Aufgrund seiner verzweigten Struktur ist Cyanophycin nicht abbaubar durch einige Proteasen (Trypsin, Pepsin, Carboxypeptidase A und Leucin-Amino-Peptidase). Ein chemischer Abbau nach Edman führte nicht zur Bildung von Arginin- oder Aspartat-phenylthiohydantoin, wie es bei Peptidbindungen der Fall wäre (Simon & Weathers 1976). Messungen durch Zirkulardichroismus- und Laser Raman Spektroskopie lassen vermuten, dass das Polymer bei neutralem pH-Wert und auch in schwach saurer Lösung teilweise β -Faltblattstruktur besitzt, in alkalischer Lösung jedoch keine geordnete Sekundärstruktur aufweist (Simon *et al.* 1980). Vermutete Modifikationen, wie z.B. durch Glykosylierung (Baumgärtel 1920) oder eine Bindung von Ionen wie K^+ (zitiert nach Fogg 1951) oder eine Bindung von DNA (Baumgärtel 1920, Bielinska *et al.* 1999) wurden nicht ausreichend untersucht, sind also noch nicht bestätigt worden.

Ziegler *et al.* (2002) klonierten ein Protein aus dem grampositiven, sporenbildenden, anaeroben Organismus *Desulfitobacterium hafniense* mit erheblicher Sequenzähnlichkeit zur cyanobakteriellen Cyanophycin-Synthetase. In *E. coli* bildete diese Synthetase ein dem Cyanophycin ähnliches Produkt, das ähnliche Aminosäurezusammensetzung, molekulare Masse und Proteasestabilität aufwies. Allerdings ist es im Gegensatz zu Cyanophycin bei neutralem pH-Wert sehr gut in Wasser löslich. Die Ähnlichkeit zu Cyanophycin wurde mittels Aminosäureanalyse, Abbauprodukten durch Cyanophycinase (siehe Abschnitt 1.3.) und Analyse der Abbauprodukte durch Dünnschichtelektrophorese und MALDI-MS bestätigt (Hejazi 2002, Ziegler *et al.* 2002). Ziegler *et al.* (2002) geben als mögliche Ursache der radikal veränderten Löslichkeitseigenschaften eine teilweise anders verzweigte Struktur an.

1.3. Cyanophycinmetabolismus

Es sind nur drei Cyanophycin metabolisierende Enzyme bekannt:

- Die Cyanophycin-Synthetase, die ATP-, Kalium-, Sulfhydrylreagenz-, Arginin- und Aspartat-abhängig Cyanophycin bildet,
- die Cyanophycinase (Gupta & Carr 1981 zu *Anabaena* PCC 7120, Allen *et al.* 1984 zu *Synechocystis* PCC 6308, Richter *et al.* 1999 zu *Synechocystis* PCC 6803, Obst *et al.* 2002 zu *Pseudomonas anguilliseptica* strain BI), die Cyanophycin in die Dipeptide β -Aspartyl-Arginin spaltet, sowie
- eine Isoaspartyldipeptidase (Hejazi 2002 und Hejazi *et al.* 2002 zu *Anabaena* sp. PCC 7120 und *Synechocystis* PCC 6803), die β -Aspartyl-Arginin in einzelne Aminosäuren spaltet.

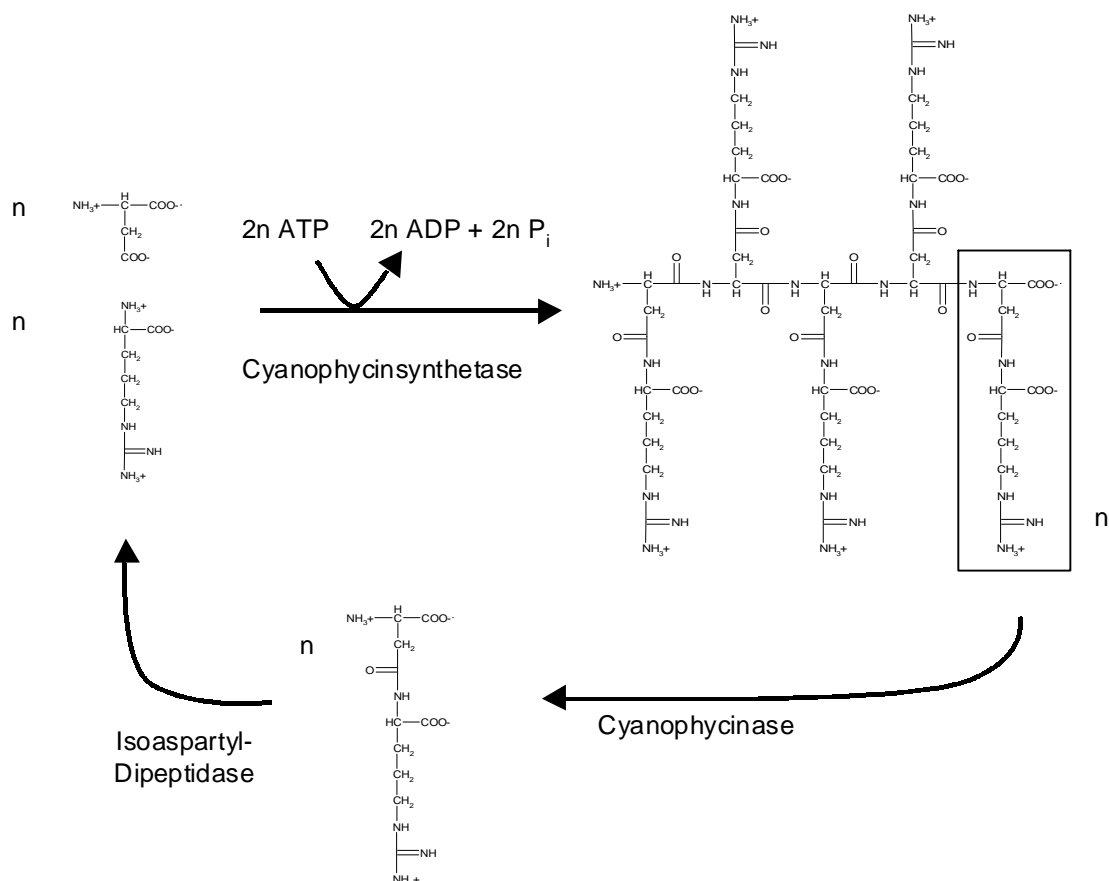


Abbildung 3: Darstellung des Cyanophycinmetabolismus

Strukturelement im Kasten: β -Asp-Arg

n: Anzahl der β -Asp-Arg-Elemente

Cyanophycin wird von Cyanobakterien nach heutigem Stand ausschließlich durch die Cyanophycinase (CphB) abgebaut. Obst *et al.* (2002) isolierten elf Bakterienarten, die in der Lage waren, Cyanophycin als einzige Quelle von Kohlenstoff und Stickstoff zu nutzen. Sie klonierten und charakterisierten eine extrazellulär vorliegende Cyanophycinase aus *Pseudomonas anguilliseptica*. Produkt dieser Peptidase ist das gleiche wie das des cyanobakteriellen Enzyms, das Dipeptid β -Asp-Arg. Es ist anzunehmen, dass viele andere Organismen, z.B. Fressfeinde von Cyanobakterien, eine abbauende Aktivität besitzen.

Wie von Hejazi (2002) untersucht, wird β -Asp-Arg durch eine Pflanzentyp-Asparaginase hydrolysiert. Soche Asparaginasen sind aus ganz verschiedenen Organismen bekannt, die untersuchten Cyanobakterien besitzen allerdings ein Enzym mit relativ hoher Affinität zu Isoaspartylidipeptiden mit basischer Aminosäure in der β -Position wie β -Asp-Arg und β -Asp-Lys.

1.4. Bedingungen für das Auftreten der Cyanophycin-Granula

Cyanophycin wird eine Funktion als Stickstoffspeicher zugeschrieben (Allen 1984, Simon 1987). Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass Cyanophycin ein sehr stickstoffreiches Polymer ist, das in der logarithmischen Wachstumsphase einer Kultur nur in geringen Mengen vorhanden ist, in älteren Kulturen und Akineten aber mehr als 5% der Trockenmasse ausmachen kann.

Allgemein gilt für einen Reservestoff, dass er in der Zelle fixiert wird. Anderenfalls würde er hinausdiffundieren oder müsste permanent, vermutlich unter Energieverlust, wieder importiert werden. Beides wird durch die physikalischen Eigenschaften von Cyanophycin gewährleistet, denn Cyanophycin ist unlöslich, ein Export oder eine Diffusion in das Medium wurde nie beobachtet. Parnas & Cohen (1976) stellten anhand theoretischer Überlegungen fest, dass für eine möglichst hohe Überlebenschance eines Organismus eine sinkende Konzentration an Nährstoffen ein Signal zur Bildung des entsprechenden Reservestoffs darstellen sollte. Die Synthese sollte also im Übergang zur stationären Phase und nicht bei Überschuss des entsprechenden Stoffes stattfinden. Dies trifft für mehrere der auf diese Frage hin untersuchten Cyanobakterien zu. So ist bei verschiedenen limitierenden Wachstumsbedingungen, d.h. z.B. in der stationären Phase einer Kultur, Cyanophycin in der Regel in hoher Menge, d.h. in Form vieler und großer Granula vorhanden (Hegler 1901, Tischer 1957, Stephan *et al.* 2000, Stephan 2000). Bei

weiterem Mangel an Stickstoff im Medium werden zuerst Phycobiliproteine, die wichtige Antennenpigmente für die Photosynthese darstellen, und erst später die Cyanophycingranula abgebaut.

Schon vor hundert Jahren wurde durch lichtmikroskopische Untersuchungen eine heute noch weitgehend gültige Beschreibung der Umstände, die zu einer Akkumulation führen können, gegeben: „Was zunächst ihre [Cyanophycinkörner] Bildung anlangt, so findet dieselbe vorzugsweise dort statt, wo eine Anhäufung von Reservestoffen ohne gleichzeitigen Consum zum Zweck des späteren Verbrauchs eintritt, also bei allen Formen mit Dauerzellen in den jugendlichen oder heranwachsenden Sporen; diese sind bei allen Formen im reifen Zustand nahezu völlig davon erfüllt. Sodann sieht man bei denjenigen Formen, welche keinen besonderen Dauerzellen besitzen, wie die *Chroococcaceen* und *Oscillariaceen* die Cyanophycinkörnerbildung in besonderem Maasse dann einsetzen, wenn die Vegetationsperiode sich ihrem Ende nähert, wenn Zelltheilungen und Entstehung neuer Individuen seltener werden und die Zellverbände in das Ruhestadium treten.

Dagegen findet man bei kräftigem Wachstum und lebhafter Theilung, wie das zu Anfang der Vegetationsperiode der Fall ist, in den theilenden und wachsenden Zellen entweder gar keine Eiweisskrystalloide [gemeint sind Cyanophycingranula] oder nur wenige ganz kleine. Es gilt dies sowohl für die isocysten als heterocysten Arten. Bei letzteren kann man beobachten, dass in Fäden mit lebhafter Theilung auch die Heterocysten frei davon sind, die sonst gewöhnlich an den Porenkanälen Krystalloide besitzen" (Hegler 1901).

Die unter Cyanobakterien weit verbreitete Möglichkeit, eine Stickstoffreserve wie Cyanophycin zu bilden, könnte, vor allem in Biotopen mit wechselnden Konzentrationen gebundenen Stickstoffs, einen Vorteil für den Bestand nicht Luftstickstoff fixierender Arten darstellen. Bei *Synechocystis* PCC 6308 wird die Bildung von Cyanophycin hauptsächlich am Anfang der stationären Wachstumsphase einer Kultur beobachtet. Die enzymatische Aktivität sowohl von Cyanophycin-Synthetase als auch Cyanophycinase ist jedoch konstitutiv (Mackerras *et al.* 1990). Ferner kommt es bei Phosphatmangel (Stevens & Paone 1981 über *Agmenellum quadruplicatum*, siehe auch Abschnitt 1.5.) oder Sulfatlimitierung (Arino *et al.* 1995 über *Gloeotheca* PCC 6909), der Zugabe von Kupfer- oder Cadmiumionen in das Medium (Surosz & Palinska 2000 über *Phormidium* OI 75), oder nach Zugabe der Aminosäuren Arginin, Asparagin (Stephan 2000 & Stephan *et*

al. (2000) über *Synechocystis* PCC 6803) oder Aspartat (Lawry & Simon 1982 über *Anabaena cylindrica*) zu einer starken Akkumulation. Von Art zu Art gibt es jedoch große Unterschiede in der Fähigkeit, stickstoffhaltige Verbindungen aus dem Medium in das Cytoplasma zu transportieren, sodass keine allgemein gültige Angabe über die Umstände gegeben werden kann, die zu einer Cyanophycin-Akkumulation in Abhängigkeit der im Medium enthaltenen stickstoffhaltigen Verbindungen führen.

1.4.1. Cyanophycin-Akkumulation und Stickstoffhaushalt der Zelle

Eine vermutete Signalfunktion des Cyanophycins oder seiner Abbauprodukte auf die Ausbildung von Heterocysten (Wolk *et al.* 1994) konnte widerlegt werden, denn eine Mutante von *A. variabilis*, in der die Cyanophycin-Synthetase deaktiviert wurde (Δ CphA), bildet funktionsfähige Heterocysten, wenn auch mit einer geringfügig erhöhten Frequenz (Ziegler *et al.* 2002). Ein zwingender Zusammenhang zwischen Heterocystenbildung und der Fähigkeit, Cyanophycin zu bilden, ist also nicht vorhanden. Dennoch ist der mögliche Zusammenhang zwischen der Fixierung von Luftstickstoff und gebundenem Stickstoff und seiner Speicherung eine Erörterung wert. Einige Cyanobakterien können N_2 der Luft fixieren, indem sie ihn durch Nitrogenase zu Ammonium reduzieren, welches anschließend durch Einbau in Kohlenstoffverbindungen dem weiteren Stickstoffmetabolismus der Zelle zugeführt werden kann.

Wie jeder enzymatische Prozess ist die Cyanophycin-Synthese durch die Verfügbarkeit der Substrate reguliert. Es existieren einige Untersuchungen, die die zeitliche und räumliche Verteilung des Auftretens von Cyanophycin-Granula und der N_2 -Fixierung beschreiben:

- Gupta & Carr (1981) berichteten bei *Anabaena cylindrica* und *Anabaena* PCC 7120 von einer 30- bis 70-mal höheren Aktivität der Cyanophycin-Synthetase und von einer 20- bis 90-fach höheren Aktivität der Cyanophycinase in Heterocysten. Die Messungen wurden im Vergleich zum Gesamtproteingehalt angegeben, lassen sich aber dennoch als erhöhte Aktivitäten in Heterocysten deuten. Heterocysten enthalten in der Regel eine große Menge an Cyanophycin, das überwiegend in den Polkörpern vorliegt. Sowohl Synthese als auch Abbau von Cyanophycin finden in beiden Zelltypen statt. Dies führte zu der Hypothese von Carr (1988), dass Cyanophycin ein dynamisches

Stickstoff-Reservoir zwischen Fixierung und Metabolisierung darstellt, d.h. dass die Cyanophycin-Akkumulation nicht durch weitere Faktoren reguliert ist.

- Mackerras *et al.* (1990) beobachteten eine sehr schnelle aber vorübergehende Akkumulation von Cyanophycin bei Zugabe von Ammoniumverbindungen zu Kulturen von *Synechocystis* PCC 6308 und *A. cylindrica*. Aktive Cyanophycinsynthetase war also schon vor einer Cyanophycin-Akkumulation vorhanden. Wenn Chloramphenicol, ein Inhibitor der ribosomalen Proteinbiosynthese, zu einer exponentiell wachsenden Kultur von *Anabaena cylindrica* gegeben wird, tritt ebenfalls eine Akkumulation von Cyanophycin ein (Simon 1973). Cyanophycin-Synthetase und Cyanophycinase in *Anabaena cylindrica* und *Synechocystis* PCC 6308 zeigten eine konstitutive Aktivität, weitgehend unabhängig von der Ammonium-Konzentration im Kulturmedium (Mackerras *et al.* 1990). *A. cylindrica* kann Zellen zu Heterocysten differenzieren, *Synechocystis* PCC 6308 nicht.
- *Cyanothece* sp. ATCC 51142, ein einzelliges, nur nachts Luftstickstoff fixierendes Cyanobakterium, akkumuliert Cyanophycin zum Ende der Nacht, das heißt nach dem Maximum der Stickstofffixierung (Sherman *et al.* 1998, Li *et al.* 2001). Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese periodische Abfolge durch eine diurnale Regulation des Cyanophycin-Metabolismus oder schlicht durch die Konzentrationen der beteiligten Substrate verursacht wird. Ein Gegenbeispiel für eine Nähe von Nitrogenaseaktivität und Auftreten von erhöhter Cyanophycin-Akkumulation findet sich in *Trichodesmium* spp.. Hier sind die Granula in den auf N₂-Fixierung spezialisierten Zellen, die in diesem Fall aber keine Heterocysten sind, weniger häufig und kleiner als in Zellen, die keine Nitrogenase enthalten (Fredriksson & Bergman 1997).

Innerhalb der Heterocysten wurde Cyanophycin speziell am Septum zwischen Heterocysten und vegetativen Zellen als Bestandteil der Polkörperchen gefunden (engl.: polar plugs, Fogg 1951, Lang 1972, Sherman *et al.* 2000, Ziegler *et al.* 2001, Abb. 4).

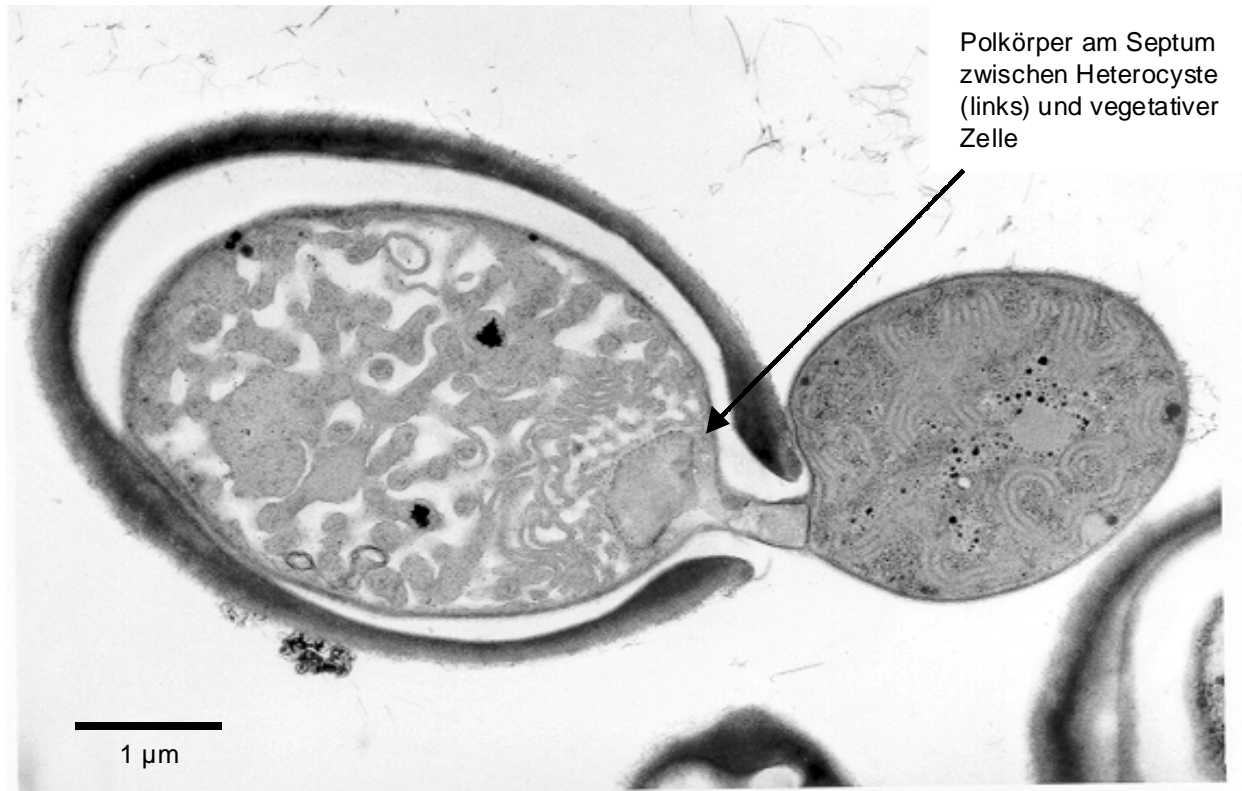


Abbildung 4: Polkörperchen am Septum zwischen Heterocyste und vegetativer Zelle

Anabaena variabilis ATCC 29413, 3 Tage auf stickstofffreiem Medium angezogen, mit freundlicher Genehmigung von Dirk P. Stephan, Universität Bielefeld.

1.4.2. Cyanophycin-Akkumulation und Akineten

Bei Differenzierung von Cyanobakterien findet man Cyanophycingranula verstärkt in Akineten (Braune & Döhler 1996, Herdman 1988). Ein notwendiger Zusammenhang zwischen Cyanophycinbildung und der Bildung bzw. der Keimung von Akineten ist aber nicht auszumachen, denn Akineten von *Cyanospira* spp. enthalten kein Cyanophycin (Sili *et al.* 1994). *Nostoc ellipsosporum* mit einer Mutation im biosynthetischen Gen *argL* bildet Akineten, aber kein Cyanophycin (Leganes *et al.* 1998). Diese Akineten können allerdings nicht keimen. Akineten von *Anabaena cylindrica*, die in Gegenwart des Argininanalogons Canavanin gezogen wurden, haben oft keine Cyanophycingranula (Nichols *et al.* 1980).

1.4.3. Cyanophycin-Akkumulation unter Stressbedingungen

Surosz & Palinska (2000) stellten bei *Phormidium* Ol 75 ein stark vermehrtes Auftreten von Cyanophycingranula nach Zugabe von Cu^{2+} oder Cd^{2+} fest. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Bildung von Polyphosphatgranula festgestellt.

Eine durch Cyanophycin verursachte Entgiftung durch Bindung von Schwermetallionen oder ein Einfluss auf die Löslichkeit von Salzen im Cytoplasma wurde nicht untersucht. Fernández-Piñas *et al.* (1995) beobachteten, dass nach Schwermetallionenexposition eine verstärkte Bildung von Polyphosphaten eintritt und diese möglicherweise Cu^{2+} oder Cd^{2+} -Ionen binden. Dadurch könnte ein Phosphatmangel eintreten, der zu erhöhter Cyanophycin-Akkumulation führt. In *A. cylindrica* wurde allerdings bei Exposition mit Pb^{2+} oder Hg^{2+} keine Veränderung der Cyanophycin-Akkumulation festgestellt (Lawry & Simon 1982).

1.4.4. Andere mögliche Funktionen von Cyanophycin

Außer der Abwesenheit von Cyanophycin zeigen weder die nicht Cyanophycin bildenden Arten, noch die ΔCphA -Mutante von Ziegler *et al.* (2001) eine auffällige Morphologie. Cyanophycin enthaltende Polkörperchen besitzen keine essentielle Funktion, denn die Heterocysten dieser ΔCphA -Mutante sind funktionsfähig.

Eine andere mögliche Funktion von Cyanophycin könnte sein, dass es eine Energiereserve darstellt, da die Argininanteile über den Arginin-Deiminase-Weg zu ATP, CO_2 , NH_4^+ und Ornithin abgebaut werden können, indem Arginin zu Citrullin und Citrullin zu Ornithin umgewandelt wird, wobei Carbamoylphosphat entsteht, das als ATP-Äquivalent genutzt werden kann (Stanier & Cohen-Bazire 1977, Weathers *et al.* 1978). Dieser Reaktionsweg wurde in einigen Cyanobakterien nachgewiesen, es ist aber unsicher, ob alle Cyanophycin produzierenden Arten entsprechende Enzyme besitzen.

Eine extrazelluläres Auftreten von Cyanophycin, außer bei Lyse der Zellen, wurde noch nie beobachtet. Ebenso gibt es keine Berichte über eine mögliche toxische oder abschreckende Wirkung des Cyanophycins z.B. gegenüber Fressfeinden.

Bei der Regulation von Auf- und Abtrieb während des Tages bei *Trichodesmium tenue* hat Cyanophycin offenbar ebenfalls keine Funktion (Romans *et al.* 1994).

1.5. Übereinstimmende Merkmale der Organismen, die Cyanophycin synthetisieren

Ein bisher übereinstimmender Befund ist, dass alle Cyanophycin produzierenden Cyanobakterien unter Phosphatmangel Cyanophycin akkumulieren. *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (Krehenbrink *et al.* 2002), der bisher einzige nichtcyanobakterielle Organismus, bei dem die Cyanophycinbildung untersucht wurde, weist die gleiche Regulation auf. Tabelle 1 zeigt Beispiele für diesen Befund.

Tabelle 1: Beispiele für Zusammenhang von Cyanophycin-Akkumulation und Phosphathaushalt der Zelle

Organismus	Bemerkungen	Autor/Autorin
<i>Acinetobacter</i> DSM 587	Ohne Phosphatlimitierung nur sehr geringe Polymer-Akkumulation	Krehenbrink <i>et al.</i> (2002)
<i>Agmenellum quadr.</i>	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Stevens & Paone (1981)
<i>Anabaena cylindrica</i>	Sowohl Polyphosphat- als auch Cyanophycingranula in den gleichen Zellen gefunden. Anzuchtbedingungen wurden nicht beschrieben. Identifizierung der Polyphosphate aufgrund elektronenmikroskopischer Aufnahmen	Lang (1972)
<i>Anabaena</i> var. Kützing	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Gloeocapsa alpicola</i>	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Nostoc</i> UAM 208	Gleichzeitiges Auftreten von Cyanophycin- und Polyphosphatgranula bei Cd ²⁺ Exposition	Fernandez-Pinas <i>et al.</i> (1995)
<i>Nostoc</i> sp.	In symbiontisch in <i>Gunnera mannica</i> lebenden Zellen wurden sehr große Cyanophycingranula gefunden, aber keine Polyphosphatgranula, in frei lebenden Zellen wurde das Gegenteil gemessen (ESI/EELS-Messungen)	Jäger <i>et al.</i> (1996)
<i>Nostoc musc.</i> Agardh	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Oscillatoria prolifera</i>	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Phormidium</i> OI75	Gleichzeitiges Auftreten von Cyanophycin- und Polyphosphatgranula bei Cd ²⁺ Exposition	Surosz & Palinska (2000)
<i>Phormidium luridum</i>	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Plectonema</i> 594	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Lawry & Simon (1982)
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	Cyanophycin-Akkumulation bei Phosphatmangel	Stephan (2000) und Stephan <i>et al.</i> (2000)

Vollständige Bezeichnungen der Organismen werden auf der folgenden Seite gegeben.

Abkürzungsverzeichnis Tabelle 1:

<i>Acinetobacter</i> DSM 587:	<i>Acinetobacter</i> sp. strain DSM 587
<i>Agmenellum quadr.</i> :	<i>Agmenellum quadruplicatum</i>
<i>Anabaena</i> var. Kützing:	<i>Anabaena variabilis</i> Kützing UTEX 1444, eventuell identisch mit <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
<i>Gloeocapsa alpicola</i> :	<i>Gloeocapsa alpicola</i> (Lyngbye) Bornet UTEX B589
<i>Nostoc musc.</i> Agardh:	<i>Nostoc muscorum</i> Agardh, evtl. identisch mit <i>Nostoc punctiforme</i>
<i>Oscillatoria prolifera</i>	<i>Oscillatoria prolifera</i> UTEX 1270
<i>Phormidium luridum</i> :	<i>Phormidium luridum</i> Boresch UTEX 426, auch: <i>Leptolyngbya</i> PCC 7602
<i>Plectonema</i> 594:	<i>Plectonema boryanum</i> Gomont UTEX 594

Ein gleichzeitiges Auffinden von Cyanophycin- und Polyphosphatgranula steht nicht in Widerspruch zu einem Phosphatmangel der Zelle. Möglicherweise verringert eine verstärkte Bildung von Polyphosphat die Menge des löslichen und damit verfügbaren Orthophosphates.

Eine andere Deutung für eine möglicherweise allgemein gültige physiologische Funktion der Cyanophycin-Synthetase wurde von Stephan (2000) gegeben: In *Synechocystis* PCC 6803 zeigten Zellen, die für drei Tage auf Arginin als einziger Stickstoffquelle gezogen wurden, einen erheblichen Abbau der Thylakoidmembranen und eine im Vergleich zur Anzucht auf Nitrat gezogenen Zellen eine geringe L-Arginin abbauende Aktivität. *Synechocystis* PCC 6803 war nicht auf Dauer auf Arginin als alleiniger Stickstoffquelle lebensfähig. Die nicht Cyanophycin bildenden Arten *Synechococcus* PCC 6301 und PCC 7942 dagegen bauen Arginin über eine, in diesen Organismen sehr aktive, L-Arginin-Oxidase/Dehydrogenase ab. Eine hohe Arginininkonzentration könnte also toxische Effekte haben.

1.6. Strategien der nichtribosomalen Peptidsynthese

Neben der ribosomalen Peptidsynthese sind aus der Natur zwei Synthesewege für Peptide bekannt:

Der Thiotemplate-Mechanismus umfasst die Adenylierung der Carboxylgruppe von z.B. Amino- oder Hydroxysäuren, die anschließend kovalent an eine 4'-Phosphopantetheingruppe des entsprechenden Enzyms gebunden werden (Thiolierung). Bei dieser Reaktion wird ATP zu AMP und Pyrophosphat hydrolysiert. Dieses gebundene Substrat wird mit einem weiteren auf gleiche Weise kovalent

gebundenen Substrat kondensiert (von Döhren *et al.* 1997, Dittmann *et al.* 2001). Peptidsynthetasen, die diesen Mechanismus nutzen, zeichnen sich durch eine charakteristische modulare Struktur aus. Bestimmte Mollusken, Pilze oder Cyanobakterien bilden über diesen Mechanismus einen oder mehrere Sekundärmetaboliten. So bildet ein Multienzymkomplex in *Microcystis aeruginosa* das hepatotoxische cyclische Heptapeptid Microcystin.

Der andere nichtribosomale Peptidsyntheseweg beinhaltet eine Phosphorylierung von Carboxylgruppen und, soweit bekannt, keine intermediäre kovalente Verknüpfung der Substrate mit der Synthetase. Ein nucleophiler Angriff des freien Elektronenpaares der α -Aminogruppe eines Aminosäuresubstrates auf das positiv polarisierte Kohlenstoffatom des Acylphosphates führt anschließend zur Ausbildung der Amidbindung. Die bisher bekannten natürlich vorkommenden Polyamide ϵ -Poly-L-Lysin, Poly- γ -D-Glutamat und Cyanophycin werden alle über diesen Mechanismus synthetisiert (Oppermann-Sanio & Steinbüchel 2001).

Die physiologischen, ökologischen und physikalischen Eigenschaften dieser Polyamide sind völlig verschieden: ϵ -Polylysin wird von *Streptomyces albulus* gebildet und sekretiert. Es scheint eine antimikrobielle Funktion zu haben. Poly- γ -Glutamat wird extrazellulär bei verschiedenen *Bacillus*-Arten sowie in den Nesselzellen von *Hydra* gefunden und ist allgemein nicht toxisch (Kunioka 1997, Yoon *et al.* 2000, Szczepanek *et al.* 2001). Beide Polymere sind in Wasser sehr gut löslich.

Das hier untersuchte Cyanophycin wird bei lebenden Kulturen nicht im Medium gefunden. Es ist unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert und Ionenstärke) in Wasser unlöslich und bildet in den Zellen Granula. Cyanophycin wird nichtribosomal von der Cyanophycin-Synthetase (CphA) gebildet (Simon 1976). Seine Funktion wird in einer dynamischen Kohlenstoff- und Stickstoffreserve vermutet (siehe Abschnitt 1.4.1., Carr 1984).

Allen diesen enzymatisch gebildeten Homopolymeren, bzw. dem Copolymer Cyanophycin ist gemeinsam, dass sie keine einheitliche Größe haben, sondern ihre molekulare Masse dispers ist.

1.7. Die Cyanophycin-Synthetase

Cyanophycin-Synthetasen aus *Anabaena cylindrica* (Simon 1976), *Synechocystis* PCC 6803 (Ziegler *et al.* 1998), *A. variabilis* ATCC 29413 (Ziegler *et al.* 1998, Berg *et al.* 2000), *Synechococcus* sp. MA 19 (Hai *et al.* 1999), *Synechocystis* PCC 6308 (Aboulmagd *et al.* 2000), *Synechococcus elongatus* (Ebert 2001), *Acinetobacter* sp. strain DSM 587 (Krehenbrink *et al.* 2002) und *Desulfitobacterium hafniense* (Ziegler *et al.* 2002) wurden charakterisiert. Zumindest für *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Anabaena variabilis* ATCC 29413 ist Cyanophycin nicht essentiell (Li *et al.* 2001, Ziegler *et al.* 2001).

Cyanophycin-Synthetasen aus verschiedenen Cyanobakterienarten konnten in anderen Bakterien aktiv exprimiert werden (Tab. 2). Alle beschriebenen heterolog exprimierten Synthetasen bildeten Cyanophycin mit einem Molekulargewicht zwischen 25 und 30 kDa. Im Gegensatz dazu liegt das Molekulargewicht des von Cyanobakterien produzierten Polymers zwischen 25 und 100 kDa (Ziegler *et al.* 1998).

Die Aminosäure Lysin als Bestandteil von Cyanophycin wurde bisher ausschließlich bei heterologer Expression von CphA aus *Anabaena variabilis* (Ziegler *et al.* 1998) und *Synechocystis* PCC 6308 in *E. coli* (Krehenbrink *et al.* 2002) gefunden, sowie in dem Polymer, das bei heterologer Expression von der CphA-ähnlichen Synthetase aus *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB-2 (Ziegler *et al.* 2002) gebildet wird.

Tabelle 2: Heterologe Expression von Cyanophycin-Synthetasen

CphA aus:	exprimiert in:	Autor (Zitat)
<i>A. variabilis</i> ATCC 29413	<i>Escherichia coli</i>	Ziegler <i>et al.</i> 1998
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	<i>Escherichia coli</i>	Ziegler <i>et al.</i> 1998
<i>Synechococcus</i> MA19	<i>Escherichia coli</i>	Hai <i>et al.</i> 1999
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ebert 2001
<i>Synechocystis</i> PCC 6308	<i>Escherichia coli</i>	Krehenbrink <i>et al.</i> 2002
<i>Synechocystis</i> PCC 6308	<i>E. coli</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Ralstonia eutropha</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Aboulmagd <i>et al.</i> 2001

Für die *in vitro*-Synthese von Cyanophycin sind die konstituierenden Aminosäuren Aspartat und Arginin, Cyanophycin als Primer, Mg-ATP, K⁺, sowie ein Thiolreagenz

wie Dithiothreitol oder Mercaptoethanol notwendig (Simon 1976, Ziegler *et al.* 1998). Im Laufe der Reaktion wird ATP zu ADP und P_i hydrolysiert. Eine Bildung von AMP wurde nicht beobachtet (Ziegler *et al.* 1998). Die apparente molekulare Masse der Synthetase aus *Anabaena variabilis* beträgt nach Abschätzung an einer kalibrierten Größenausschlusschromatografiesäule 230 ± 30 kDa, in der SDS-PAGE beträgt die Masse ca. 100 kDa, in Übereinstimmung mit der berechneten Masse der aus der Sequenz des Gens *cphA* abgeleiteten Aminosäuresequenz (Ziegler *et al.* 1998). Die Massendifferenz zwischen der Molmasse, die in der denaturierenden SDS-PAGE gemessen wird, und der Abschätzung aufgrund des Laufverhaltens an der kalibrierten Größenausschlusschromatografiesäule lässt vermuten, dass Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* in Lösung als Homodimer vorliegt.

Die Substratspezifität von Cyanophycin-Synthetasen unterschiedlicher Organismen, d.h. ihre Aktivität sowohl mit verschiedenen Aminosäurederivaten wie auch mit verschiedenen synthetischen Primern, wurden in den letzten Jahren mehrfach untersucht (Übersicht der als Aminosäuresubstrat oder Analogen untersuchten Verbindungen in Abschnitt 6.4.).

Ein Einbau von Canavanin, Ornithin und Lysin anstelle von Arginin, sowie ein Einbau von Aspartat- β -Methylester (Aboulmagd *et al.* 2001) und β -Hydroxy-L-Aspartat anstelle von Aspartat (Strukturformeln im Anhang 6.4.) konnte nachgewiesen werden (diese Arbeit zu *A. variabilis*, Aboulmagd *et al.* 2001 zu *Synechocystis* PCC 6308, Hai *et al.* 2002 zu *Synechococcus* MA19). Argininmethylester und Argininamid führten zu einer Hemmung des Einbaus jeglicher Aminosäuresubstrate bei CphA aus *Synechocystis* PCC 6308 (Aboulmagd *et al.* 2001).

Bei Versuchen mit CphA aus *Synechococcus* sp. strain MA 19 zeigten Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure, N-Acetylglucosamin, eine Membranfraktion von *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 und Aspartatreiches Exopolymer aus *Klebsiella* sp. Aktivität als Primer. Die Primer-Wirkungen wurden allerdings, mit Ausnahme einer speziellen Charge Poly- α,β -D,L-Asparaginsäure, nur mit ungereinigter Synthetase gemessen, sodass andere im *E. coli*-Rohextrakt enthaltene Stoffe (es wurde heterolog in *E. coli* exprimierte Cyanophycin-Synthetase verwendet) eine Rolle spielen könnten (Hai *et al.* 2002, heterolog exprimierte Cyanophycin-Synthetase von *Synechococcus* sp. strain MA 19).

1.8. Verbreitung der Cyanophycin-Synthetase

Von den potentiellen Cyanophycin-Synthetase-Genen, die in nicht-cyanobakteriellen Organismen gefunden wurden (Sequenzen im Anhang), wurden *cphA* aus *Acinetobacter* sp. strain ADP-1 (Krehenbrink *et al.* 2002) und *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB-2 (Ziegler *et al.* 2002) in *E. coli* exprimiert. Beide Synthetasen bildeten einen dem Cyanophycin ähnlichen Stoff, jedoch ist das von der Synthetase aus *D. hafniense* gebildete Polymer bei neutralem pH-Wert sehr gut wasserlöslich.

Möglicherweise bilden mehr Organismen als bisher angenommen ein solches dem Cyanophycin ähnliches Polymer. Darauf deuten DNA-Datenbankabgleiche hin, bei denen Gene mit hoher Homologie zu Cyanophycin-Synthetase-Genen in etwa 10% der Eubakteriengenome gefunden wurden. Weitergehende Untersuchungen fehlen jedoch.

Unter den Cyanobakterien sind bis heute nur acht Arten bekannt, die keine Cyanophycingranula bilden. Unter diesen Arten gehören sechs zu der Gattung *Synechococcus*, sowie zwei Arten zur Gattung *Prochlorococcus*, bei denen das Genom vollständig sequenziert ist und kein die Cyanophycin-Synthetase codierendes Gen gefunden wurde (*Prochlorococcus marinus* MIT 9313 und Stamm MED 4). Unter den *Synechococcus*-Arten ohne Cyanophycin-Synthetase sind sowohl ozeanische als auch Frischwasserarten (Lawry & Simon 1982, Newman *et al.* 1987, Görl *et al.* 1998, Ziegler *et al.* 1998).

Ein durch Insertionsmutagenese bewirktes Ausschalten der Funktion des Gens *cphA* in *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Li *et al.* 2001) oder entsprechend in *Anabaena variabilis* (Ziegler *et al.* 2001) führte erwartungsgemäß dazu, dass kein Cyanophycin mehr gebildet wurde. In beiden Fällen scheint also die einzige funktionale Cyanophycin-Synthetase der Organismen zerstört worden zu sein. Beide Mutanten waren lebensfähig, die $\Delta cphA$ -Mutante von *Anabaena variabilis* wächst aber auf N_2 als einziger Stickstoffquelle bei hoher Lichtintensität viel langsamer (Ziegler *et al.* 2001). Das nicht erwartete Ausbleiben der Akkumulation von Cyanophycin bei einer knock-out-Mutante, bei der das Cyanophycin-hydrolysierende Enzym Cyanophycinase (CphB) in *Synechocystis* PCC 6803 zerstört wurde ($\Delta CphB$), muss mit Kotranskription der im Genom benachbarten Gene, unbekannten sekundären Effekten oder einer Regulation der Enzymaktivität erklärt werden (Li *et al.* 2001).

1.9. Primärsequenz und strukturelle Merkmale der Cyanophycin-Synthetase

Cyanophycin-Synthetasen katalysieren die Ausbildung zweier verschiedener Amidbindungen, einer Peptid- und einer Isopeptidbindung. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cyanobakteriellen Cyanophycin-Synthetasen CphA haben untereinander eine große Ähnlichkeit. Sequenzidentitäten reichen von 99,2% (*Anabaena* 29413 vs. *Anabaena* 7120) bis 65,6% Identität (*Nostoc punctiforme* vs. *Synechocystis* 6308). Die Größe der Synthetasen liegt zwischen 872 und 901 Aminosäureresten (*Cyanothece* ATCC 51142 bzw. *A. variabilis*, siehe Abschnitt 6.3.1. und Berg *et al.* 2000).

Die Aminosäuresequenz der Cyanophycin-Synthetasen lässt sich in zwei Bereiche teilen, die jeweils deutliche Homologien zu anderen Enzymen aufweisen (Ziegler *et al.* 1998). Die C-terminale Region hat Ähnlichkeit zu einer gut charakterisierten Superfamilie, der z.B. an der Biosynthese des Mureins beteiligte Enzyme (MurC, MurD, MurE und MurF) und die Folyl-poly- γ -Glutamat-Ligase angehören. Konserviert und charakteristisch für diese Enzyme ist ein abgewandeltes „P-loop“-Motiv (Saraste *et al.* 1990, in Abschnitt 6.3. gekennzeichnet), das an der Nucleotidbindung beteiligt ist. Es gibt Röntgen-Kristallstrukturanalysen von MurD (Bertrand *et al.* 1997, 1999, 2000) und MurF (Yan *et al.* 2000). In Studien zu konservierten Bereichen innerhalb der MurD-Sequenzen konnten vier konservierte Regionen identifiziert werden (Eveland *et al.* 1997). Mittels biochemischer Untersuchungen an ortsgerichtet mutierten MurD-Proteinen (Bouhss *et al.* 1997, 1999) wurde die katalytische Funktion einiger Aminosäurereste geklärt.

Der N-terminale Bereich der Cyanophycin-Synthetase hat Ähnlichkeit zu einer anderen Ligase-Superfamilie, der verschiedene Carboxylat-Amin- und Carboxylat-Thiol-Ligasen angehören. Charakteristisch für diese Enzymfamilie ist eine ATP-Bindungsstelle, die durch den sogenannten „ATP-grasp-fold“ gekennzeichnet ist. Obwohl die Aminosäuresequenzähnlichkeit innerhalb dieser Superfamilie gering ist, existiert eine ähnliche dreidimensionale Proteinstruktur (Murzin 1996, Galperin & Koonin 1997). Charakteristische und teilweise konservierte Motive sind „B-loop“ und „J-loop“ (siehe Abschnitt 6.3.).

Für die Planung von ortsgerichteten Mutagenesen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, diente die Ähnlichkeit der Cyanophycin-Synthetase zu Proteinen bekannter Kristallstruktur als Leitfaden.

Ziel dieser Arbeit war es, zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* beizutragen. Es wurden qualitative biochemische Untersuchungen zu Syntheserichtung, zum Ablauf der Aminosäureinkorporation und zur Substratspezifität durchgeführt. Durch gentechnische Modifikationen der Cyanophycin-Synthetase sollte eine Zuordnung der aktiven Zentren der Synthetase zu Einzelschritten der Gesamtreaktion ermöglicht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Bachem Biochemicals, Heidelberg

β -Asp-Ala

α -Asp-Arg

β -Asp-Gly

β -Asp-His

β -Asp-Leu

β -Asp-Lys

β -Asp-Phe

α -Arg-Asp

γ -Glu-Leu

Fmoc-Asp-OtBu

H-Arg(Pmc)-OtBu

Becton Dickinson and Company, Microbiology Systems, Sparks, USA

Bacto Agar

LB-Medium

LB-Agar

Bacto-Trypton

Hefeextrakt

BioRad Laboratories, Richmond, USA

Tween-20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaureat)

Feinchemie KG, Sebnitz

Bromphenolblau

Fluka Chemie, Schweiz

p-Cumarsäure

Merck GmbH, Darmstadt

Ethidiumbromid

Novabiochem, Bad Soden

Dicyclohexylcarbodiimid/N-hydroxybenzotriazol

Fmoc-Asp-OAll

Fmoc-6-Aminohexansäure

PeqLab, Erlangen

Agarose

Rapp Polymere, Tübingen

Fmoc-Arg(Pmc)-TentaGel-S-PHB Harz

Fmoc-Asp(OtBu)-TentaGel-S-PHB Harz

TentaGel-SRAM Harz

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Ampicillin

C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Ammoniumsulfat

1,4-Dithiothreitol

EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat

Essigsäure

Formamid

Glycerin

Glycin

1N HCl

IPTG

Kaliumchlorid

Laurylsulfat, Natriumsalz (SDS)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat

Methanol

1N NaOH

Natriumacetat

Natriumchlorid

Natriumhydroxid

Natriumthiosulfat

2-Propanol

Proteinstandard prestained

Roti-Phoresis (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1, w/w), 40%-Lösung (w/v))

Roti-Quant

Roti-Szint, Szintillationscocktail

Saccharose

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-Diaminomethan)

Trichloressigsäure

Tris

Triton X-100

Wasserstoffperoxid

X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid)

Serva Feinbiochemika, Heidelberg

Coomassie Brilliant Blau R-250

Ninhydrin (Feststoff)

Nitrocellulose-Membran NC 45

Proteinstandard Mix 4, Mix 5

Protein A-Peroxidasekonjugat

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen und Steinheim

APS (Ammoniumperoxodisulfat)

L-Asparagin

L-Aspartat

L-Arginin

Citrullin

α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure

Desoxycholsäure

Dimethylformamid

Dinatriumdihydrogenphosphat

Ethylenglykol

L-Glutamat

L-Glutamin

Imidazol
 Luminol (3-Aminophthalsäure-Hydrazid)
 L-Lysin
 N-Methyl-Anilin
 Natriumdihydrogenphosphat
 Ninhydrin-Reagenz
 Ornithin
 Piperidin
 Ponceau S
 Rinderserum-Albumin (BSA)
 Tetrakis-(triphenylphosphin)-Palladium(0)
 Triisobutylsilan (TIBS)
 Xylencyanol

2.1.2. Radiochemikalien

Amersham Biosciences, Freiburg

L-[2, 3, 4, 5-³H] Arginin (37 MBq/ml); L-[2, 3-³H] Aspartat (37 MBq/ml)

Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

γ -[³²P]-ATP (400 MBq/ml, 110 TBq/mmol)

L-[4,5-³H(N)]-Lysin (37 MBq/ml, 1,48TBq/ μ mol),

2.1.3. Enzyme

New England BioLabs

Endonucleasen

Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I)

T4-Ligase

2.1.4. Säulen-Material

Amersham Pharmacia Biotec GmbH, Freiburg

BlueSepharose CL-6B

PD-10 Entsalzungssäule, vorgepackt mit Sephadex G-25

Superdex-200-Säule

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose

Vydac, Hesperia, CA, USA

Vydac 201SP54 C-18 column

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Aspartat-Agarose

Arginin-Agarose

DEAE-Cellulose

Octyl-Sepharose CL-4B

Phenyl-Sepharose CL-4B

BioRad Laboratories, Richmond, USA

BioGel P-2

Hydroxyapatit BioGel HTP

Methyl-Sepharose HIC Cartridge

2.1.5. Kits

Promega Corporation, Madison, USA

GeneEditor™ *in vitro* Site Directed Mutagenesis System

Qiagen, Hilden

Gel Extraction Kit-150

Taq-Polymerase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

High Pure Plasmid Isolation Kit

2.1.6. Nucleinsäuren

Die verwendeten Oligonucleotide stammen von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) und wurden als Primer für ortsgerichtete Mutagenesen mit dem GeneEditor Kit (Promega) oder für Polymerasekettenreaktionen eingesetzt.

Tabelle 3: Eingesetzte Primer

Primer	Sequenz
WL 92	5´-CTACTATCGACTCGAGCAAAG-3´
WL 96	5´-CCTATTCATATGAGAATCC-3´
WL 141	5´-CCAAC TACTCCATATGGCAGGTTACAC-3´
WL 153	5´-ACCGGCACTAACGGCGCCACCACCACTACC-3´
WL 154	5´-CCGATTGTCATCGGGCCCCTAGATGGC-3´
WL 161	5´-GTCAATCATTGTTGCGCGCTATTACGTTGGGCG-3´
WL 162	5´-TATTTAAGGGCAACTGCAGCCCTGAGTACAGGT-3´
WL 226	5´-CGGCGCAGCCTCGAGTTAGACAATTACACC-3´

2.1.7. Filter, Röntgenfilme, sonstiges Material

Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England

Hyperfilm β max

Amicon, Bedford, USA

Centriprep YM-10

C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Whatmanpapier

2.1.8. Technische Geräte

Beckman Instruments Inc, Fullerton, USA

Ultrazentrifuge L70

Szintillationszähler LS 6500

Tischzentrifuge Sorvall GS-15R

Biometra, Göttingen

Transilluminator

BioRad Laboratories, Richmond, USA

Bio-Ice-Cooling Unit

Geltrockner Gel Dryer Model 583

Mini-PROTEAN™-Elektrophoreseeinheit

Stromversorgungsgeräte

Christ, Osterode

Lyophilisationsanlage Alpha 1-2

Emich Ultraschall GmbH, Berlin

Ultraschall USD 30

Eppendorf AG, Hamburg

Centrifuge 5402

Centrifuge 5414C

Thermomixer 5436

Heidolph, Schwabach

Vortexer Heidolph REAX 2000

Kontron, Eching/München

HPLC-Pumpe 422

HPLC-Gradient Former 425

HPLC-Detector 430

UVICON Double Beam UV/VIS Spectrophotometer 933

Perkin Elmer, Überlingen

DNA Thermal Cycler

Sorvall, Albertville, USA

Sorvall RC 5B plus (Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge)

Uniequip, Martinsried

Rotationsverdampfer 100H

Vakuubrand, Wertheim

Membran-Vakuumpumpe

2.1.9. Biologisches Material

2.1.9.1. Bakterienstämme

Die *E. coli* Stämme DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*) und BL21[DE3] (*hsdS* *gal* (λ *clts857* *ind1* *Sam7* *nin5* *lacUV5-T7* gene 1)) wurden von der Firma Clontech (Palo Alto, USA) bezogen.

2.1.9.2. Plasmide

Für Klonierungen wurden folgende Plasmide verwendet:

- pBluescript II SK(+) (amp; *lacZ*+) (Stratagene, Heidelberg) für die ortsgerichtete Mutagenesen
- pET19b (amp; His₁₀) (Novagen, Madison, USA) als Expressionsvektor
- pGEM-T Vektor (Promega Corporation, Madison, USA), für die Klonierungen des separat exprimierten C- bzw. N-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase

2.2. Methoden

2.2.1. Anzuchtbedingungen, Zellernte und Zellaufbruch

2.2.1.1. Anzuchtbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf LB-Agar-Platten oder in zweifach konzentriertem LB-Medium unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kulturen auf festem Medium und die 5 ml-Kulturen für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden über 18h bei 37°C angezogen, für die Isolierung von rekombinanten Enzymen wurden 500 ml-Kulturen (18h, 25°C) ohne Induktion durch IPTG eingesetzt.

Die Anzuchtmedien wurden wie folgt hergestellt:

LB-Medium (flüssig):	2,0% Trypton (w/v)
	1,0% Hefeextrakt (w/v)
	1,0% NaCl (w/v)
LB-Medium (fest):	1,0% Trypton (w/v)
	0,5% Hefeextrakt (w/v)
	1,0% NaCl (w/v)
	1,4% Agar (w/v)

Ampicillin wurde zu einer Endkonzentration von 125 µg/ml zugesetzt.

2.2.1.2. Zellernte

E. coli-Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 6500xg) in einem GSA-Rotor (Sorvall) aus der Kulturflüssigkeit gewonnen. Die pelletierten Zellen wurden einmal mit Aufschlusspuffer (Puffer A) gewaschen und anschließend in Puffer A aufgenommen. Die Zellsuspension wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C aufbewahrt.

Puffer A:	50 mM Tris/HCl pH 8,2
	20 mM KCl
	1 mM EDTA
	2,5 mM DTT

2.2.1.3. Zellaufbruch und Herstellung des Rohextraktes

E. coli-Zellen wurden unter Eiskühlung durch Ultraschallbehandlung (USD 30, Emich Ultraschall, Berlin) in 30 ml Puffer A aufgeschlossen. Der Aufschluss durch Ultraschall erfolgte mit einer relativen Amplitude von 25-30, bei 15 s Puls und 15 s Pause, über 5-10 min.

Anschließend wurde die erhaltene Suspension 30 min bei 30000xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einer Ultrazentrifuge (Beckman L70) im Ti-70-Rotor für 1 h bei 120000xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung auf 30% Sättigung (v/v)

gebracht und anschließend 15 min bei 30000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 50 ml Puffer B aufgenommen.

Puffer B: 20 mM Tris/HCl pH 8,2
 50 mM KCl
 1 mM EDTA
 2,5 mM DTT

2.2.2. Reinigung der Proteine

2.2.2.1. Reinigung des Wildtyp-Enzyms und der mutierten Cyanophycin-Synthetasen an BlueSepharose CL-6B

Die Reinigung der Proteine erfolgte bei Raumtemperatur. Die Flussgeschwindigkeit betrug bei Beladung und Elution 1 ml/min, bei den Waschschritten 5 ml/min. Der Rohextrakt wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte Säule mit BlueSepharose CL-6B (Säulengeometrie 5 cm x 2,5 cm) gegeben. Die mit der Synthetase beladene Säule wurde mit je 50 ml Puffer des folgenden Protokolls gewaschen:

Puffer C	250 mM Natriumphosphat, pH 6,5, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT
Puffer B	siehe oben
Puffer D	20 mM Tris/HCl pH 8,2, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 20% Ethylenglykol (v/v)
Puffer B	siehe oben
Puffer E	20 mM Tris/HCl pH 8,2, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT
Puffer F	20 mM Tris/HCl pH 8,2, 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM DTT, 50% Ethylenglykol (v/v)

Die mit Puffer F eluierten Fraktionen von jeweils 1 ml wurden mittels SDS-PAGE untersucht und diejenigen mit dem höchsten Synthetasegehalt vereinigt. Anschließend wurde die Lösung auf eine Ammoniumsulfat-Sättigung von 50% (v/v) gebracht. Nach einer Stunde auf Eis wurde das gefällte Protein bei 15 min, 30000xg und 4°C pelletiert, der Überstand dekantiert, das Pellet in 2,5 ml Puffer B aufgenommen und an einer PD-10 Säule (Pharmacia) in Puffer B umpuffert.

2.2.2.2. Reinigung von Cyanophycin-Synthetase/His₁₀-tag-Fusionsproteinen an Ni-NTA-Agarose

Für die Reinigung an der mit Nickel beladenen NTA-Säule (2 cm x 1 cm, Qiagen, Hilden) wurde der mit Ammoniumsulfat gefällte Rohextrakt in ca. 40 ml Binde-Puffer (Puffer G) aufgenommen und anschließend bei 18000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, SS-34 Rotor).

Puffer G: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1 mM Mercaptoethanol

Der gelöste Rohextrakt aus dem Überstand wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 0,5 ml/min an ca. 1,25 ml Ni-NTA-Agarose gebunden. Die Säule wurde anschließend mit ca. 40 ml Wasch-Puffer (Puffer H) bei einer Flussgeschwindigkeit von ca. 3-4 ml/min gewaschen.

Puffer H: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1 mM Mercaptoethanol, 20 mM Imidazol

Es wurde mit aufsteigenden Imidazolkonzentrationen mit je 3 ml Puffer I ohne Zugabe von Triton X-100 eluiert.

Puffer I: 20 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,5 M NaCl, 1 mM Mercaptoethanol, Imidazolkonzentrationen: 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 1000 mM Imidazol.

Die letzte Elution wurde mit ca. 40 ml des Elutionspuffers der höchsten Imidazolkonzentration durchgeführt, oder so lange, bis nur noch eine geringe Menge Protein nachweisbar war (Bradfordtest auf Mikrotiterplatte). Die überwiegende Menge des Enzyms eluierte bei Imidazolkonzentrationen von 200 mM und 500 mM Imidazol. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Synthetasegehalt und Verunreinigungen untersucht, die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt, bzw. den wenigsten Verunreinigungen, wurden über eine PD-10 Säule in Puffer B umgepuffert.

2.2.2.3. Trennung an Hi load Superdex-200

Die Größenausschlusschromatographiesäule Superdex-200 (Pharmacia) wurde an einer HPLC-Anlage (Kontron Instruments) betrieben. Sie hatte ein Gelvolumen von 120 ml und eine Betthöhe von 60 cm. Die Läufe wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 10°C mit Puffer B (Abschnitt 2.2.1.3.) durchgeführt. Das Fraktionsvolumen betrug 2 ml. Fraktionen, die Synthetase enthielten, wurden mittels SDS-PAGE, Immunblot und Aktivitätstest untersucht und anschließend teilweise durch Centripreps (Amicon) konzentriert.

2.2.3. Synthese verschiedener Peptide

2.2.3.1. Synthese der Cyanophycinprimer

Die verzweigten Peptide $(\beta\text{-Asp-Arg})_3$ ($= (\text{DR})_3$), $(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$ ($= (\text{DR})_3\text{-D}$), $(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-}(\beta\text{-Asp-Arg})_3$ ($= (\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(DR)}_3$) und $(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-(}\epsilon\text{-Ahx)}_2$ ($= (\text{DR})_3\text{-(}\epsilon\text{-Ahx)}_2$) (Abb. 5, Abschnitt 3.3.) wurden an einer festen Phase über die Fmoc/tBu-Chemie synthetisiert. Als Aktivierungsreagenz wurde TBTU verwendet, der Synthesebaustein ist jeweils Fmoc-Asp-[Arg(Pmc)-OtBu]-OH. Dieser Dipeptidbaustein wurde in Lösung über Acylierung von H-Arg(Pmc)-OtBu mit Fmoc-Asp-OAll durch das Aktivierungsreagenz DCCD/N-Hydroxy-Benzotriazol und anschließender Spaltung des Allylestere durch N-Methyl-Anilin und Tetrakis-(Triphenylphosphin)-Palladium(0) hergestellt. Als feste Phase für die Synthese der Peptide $(\beta\text{-Asp-Arg})_3$ und $(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(}\beta\text{-Asp-Arg)}_3$ wurde das mit Arginin beladene Fmoc-Arg(Pmc)-TentaGel-S-PHB-Harz gewählt.

Die Synthese wurde mit der Kopplung von Fmoc-Asp-OtBu an ein Harz, an das Arginin vorgekoppelt ist, begonnen. Produkt war das teilweise geschützte am Harz gebundene Dipeptid $\beta\text{-Asp-Arg}$. Der Peptidprimer $(\beta\text{-Asp-Arg})_3$ setzte sich aus dem Koppeln des Dipeptides am Harz und dem zweimaligen Koppeln mit dem Baustein Fmoc-Asp-[Arg(Pmc)-OtBu]-OH zusammen. Der N-terminal blockierte Primer $(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(}\beta\text{-Asp-Arg)}_3$ wurde durch zweimaliges weiteres Koppeln des wie oben beschrieben synthetisierten Primers $(\text{DR})_3$ mit jeweils einem Molekül 6-Aminohexansäure synthetisiert. Das Entfernen der Schutzgruppen und die Abspaltung vom Harz wurde durch Behandlung mit 94% TFA (v/v), 1% Phenol (w/v), 2% Wasser (v/v) und 3% TIBS (w/v) durchgeführt. Produkte waren jeweils die freien Säuren (Abb. 5).

Der C-terminal blockierte Primer (β -Asp-Arg)₃-(ϵ -Ahx)₂ wurde am TentaGel-SRAM-Harz durch zweimaliges Koppeln von 6-Aminohexansäure, dreimaliges Koppeln des teilweise geschützten Dipeptidbausteins (s.o.) und Entschützen und Abspaltung (s.o.) erreicht. Produkt war ein Carboxamid (Abb. 5).

Das Peptid (DR)₃-D wurde durch dreimaliges Koppeln des Dipeptidbausteins an das mit Aspartat beladene Harz Fmoc-Asp(OtBu)-TentaGel-S-PHB synthetisiert. Entschützung und Abspaltung (s.o.) führte zur freien Säure (Abb. 5).

Alle Produkte wurden mit Hilfe einer hydrophilen C₁₈-Säule (Vydac 201SP54) gereinigt (Gradient: 0 min, 100% H₂O; 20 min, 95% H₂O, 5% Acetonitril (v/v)) und mittels RP-HPLC und MALDI-MS analysiert.

2.2.3.2. Synthese von β -Asp-Arg

Das Dipeptid β -Asp-Arg wurde an dem mit Arginin beladenen Harz Fmoc-Arg(Pmc)-TentaGel-S-PHB ebenfalls mittels Fmoc/tBu-Verfahren hergestellt. Nach der Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in Dimethylformamid (v/v) wurde das Harz mit einem vierfachen Überschuss Boc-Asp-OtBu und achtfachen Überschuss TBTU in DMF behandelt (zweifache Kopplung, Kopplungszeit 20 min). Das Peptid wurde mit 94% TFA (v/v), 1% Phenol (w/v), 2% Wasser (v/v) und 3% TIBS (w/v) vom Harz abgespalten, mit kaltem *t*-Butyl-Phenylether gefällt, mit Hilfe einer C₁₈-Säule (Vydac 201SP54) gereinigt und mittels RP-HPLC und MALDI-MS analysiert. Die Primer aus Abbildung 5 wurden für Ansätze wie in Methoden 2.2.5. beschrieben verwendet.

2.2.4. Analytische Verfahren

2.2.4.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte in der Mini-Protean II Einheit (Bio-Rad) im Puffersystem von Laemmli (1970). Für die Überprüfung der Reinheit der Enzyme wurden Gele mit einem Acrylamidanteil von 12% (w/v) verwendet. Für die Untersuchungen von Cyanophycin wurden Gele mit einem Acrylamidanteil von 15% (w/v) benutzt. In der Regel wurde der Proteinstandard „Mix 4“ (Serva) verwendet, bei Versuchen mit [³²P]- Markierung wurde der Proteinstandard prestained (Roth) verwendet.

Zusammensetzung des Sammelgels:

1,83 ml	<i>Aqua destillata</i>
0,75 ml	0,5 M Tris/HCl-Lösung in H ₂ O, pH 6,8
30 µl	10% SDS-Lösung in H ₂ O (w/v)
0,39 ml	40%-Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Roti-Phorese)
3 µl	TEMED
30 µl	10% APS (w/v)

Zusammensetzung des Trenngels:

2,5 ml	0,8 M Tris/HCl-Lösung in H ₂ O, pH 8,8
0,1 ml	10% SDS-Lösung in H ₂ O (w/v)
0,01 ml	TEMED
0,1 ml	APS

15%-Gele:	2,34 ml	<i>Aqua destillata</i>
	5,01 ml	40%-Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Roti-Phorese)

12%-Gele:	3,35 ml	<i>Aqua destillata</i>
	4 ml	40%-Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Roti-Phorese)

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Proben für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zuerst einer DOC-TCA-Fällung unterzogen und anschließend in den Puffern nach Chua (1982) aufgenommen.

DOC-TCA-Fällung:

Die Probe wurde mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt, 25 µl 2% (w/v) Natrium-Desoxycholat dazugegeben und gemischt. Nach 0-15 min auf Eis wurden 30 µl 40% (w/v) Trichloressigsäure dazugegeben, gemischt und 5 min zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 14000 rpm). Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt, das Pellet in 3 Volumenteilen Chua-Puffer A aufgenommen, sodass eine klare Lösung entstand.

PAGE-Probenpuffer nach Chua (1982):

Chua A 0,1 M Na₂CO₃
 0,1 M DTT

Anschließend wurden 2 Volumenteile Chua B dazugegeben.

Chua B 5% (w/v) SDS
 30% (w/v) Saccharose
 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Wenn die Probe nicht blau blieb, wurde mit möglichst wenig 1 M NaOH alkalisiert. Nach kurzem Aufkochen der Mischung erfolgte der Auftrag auf das Gel. Für Phosphorylierungsexperimente oder wenn angegeben wurde 2×SDS-PAGE-Probenpuffer verwendet.

2×SDS-PAGE-Probenpuffer:

62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
 10% (v/v) Glycerin
 2% (w/v) SDS
 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,001% (w/v) Bromphenolblau

2.2.4.2. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden mit 0,25% (w/v) Coomassie Blue R-250-Lösung (Serva) in 40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v) gefärbt und danach mit Entfärberlösung (Ethanol:Eisessig:*Aqua dest.* = 5:1:4) über 2 h entfärbt.

2.2.4.3. Immunblot

Immunblots wurden verwendet, um die Cyanophycin-Synthetase sowie ihre mutagenisierten Varianten nachzuweisen. Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mit einer Elektro-Blot-Apparatur (Mini Protean II, Bio-Rad) bei einer Stromstärke von 400 mA unter Eiskühlung für 45 min auf eine Nitrocellulosemembran (NC 45, Serva, Heidelberg) transferiert. Das Gel und die Nitrocellulosemembran wurden zuvor für 20 min in Elektrotransfer-Puffer equilibriert.

Danach erfolgte eine Färbung der Membran mit 0,2% Ponceau S (w/v) in 3% TCA (w/v), um den Proteinstandard zu markieren. Die Membran wurde dann für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in T-TBS-Puffer (siehe unten) mit 5% Trockenmilch (w/v) geblockt. Danach erfolgte ein dreimaliges fünfminütiges Waschen mit T-TBS und 1% Trockenmilch (w/v). Die Membran wurde für 1-2 h mit den primären polyklonalen Antikörpern (anti-CphA wurde 1:50 verdünnt, Gabe von Dr. Karl Ziegler, siehe Ziegler *et al.* 2001) in T-TBS und 1% Trockenmilch (w/v) inkubiert. Es folgten erneut dreimal eine fünfminütige und einmal eine fünfzehnminütige Waschprozedur in T-TBS und 1% Trockenmilch (w/v). Nun wurde die Membran für 45 min mit 1:2000 verdünntem Protein A-Peroxidase-Konjugat in T-TBS-Puffer inkubiert und anschließend dreimal für 15 min in T-TBS-Puffer gewaschen. Die Immuno-Detektion erfolgte nach dem ECL-Western-Blot-Protokoll (Amersham/Life Science). Es wurden 22 µl p-Cumarsäure-Lösung (90 mM in DMSO), 50 µl Luminol-Lösung (250 mM 3-Aminophthalsäure-hydrazid in DMSO) und 3 µl Wasserstoffperoxid (30%, v/v) in 10 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, gemischt, die Lösung sofort auf die Membran gegeben und für 1 min geschüttelt. Das Auflegen des Röntgenfilms (Hyperfilm, Amersham/Buchler), die Exposition für 5-20 Sekunden, sowie die Entwicklung wurden im Dunkeln durchgeführt.

Elektroblot-Puffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% Methanol (v/v)
TBS	20 mM Tris/HCl pH 7,6
	137 mM NaCl
T-TBS	0,1% Tween-20 (v/v)
	20 mM Tris/HCl pH 7,6
	137 mM NaCl

2.2.4.4. MALDI-TOF-Massenspektroskopie

Identifizierung der Peptide erfolgten mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie (Benchtop II mass spectrometer, PerSeptive Biosystems). Eine weitere Messung erfolgte durch Dr. Jens Mattow (MPI für Infektionsbiologie, Berlin). Matrixsubstanz war jeweils α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure. Andere getestete Matrixsubstanzen führten zu Messungen mit viel geringerer Signalstärke. 1 µl einer gesättigten

α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure-Lösung in einer Mischung aus 50% Acetonitril und 50% H₂O (v/v) wurden auf den Probenträger aufgetragen. Nach dem Verdunsten der Lösungsmittel wurde 1 μ l des in H₂O gelösten Peptids unter leichtem Kratzen und Mischen in die Matrixschicht eingebracht.

2.2.4.5. Quantitative Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Es wurden Fertigreagenz (Roti-Quant, Roth) und Mikrotiterplatten (Gesamtvolumen 100 μ l) verwendet. Die Synthetasekonzentration konnte nach Kalibrierung mit BSA abgeschätzt werden, wenn wenig andere Proteine oder Abbauprodukte vorlagen. Zusätzlich wurde mit BSA als Proteinstandard die Synthetasekonzentration mittels SDS-PAGE evaluiert.

2.2.5. Biochemische Untersuchungen

2.2.5.1. Reaktionsbedingungen für den Einbau von [³H]-markierten Substraten

Die Bestimmung der Cyanophycin-Synthetase-Aktivität wurde auf Grundlage der Arbeit von Simon (1976) mit den von Ziegler *et al.* (1998) beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 125 μ l, die Endkonzentrationen der einzelnen Komponenten waren wie folgt:

Ansätze mit [³H]-Arg:

50 mM	Tris/HCl pH 8,2
50 mM	KCl
20 mM	MgCl ₂
2,5 mM	DTT
4 mM	ATP
200 μ M	L-Aspartat
10 μ M	[³ H]-L-Arginin, 14,8 TBq/mol
0,87 mg/ml	Cyanophycin
0-50 μ l/Ansatz	Proteinfraktion

Ansätze mit [³H]-Asp:

50 mM	Tris/HCl pH 8,2
50 mM	KCl
20 mM	MgCl ₂
2,5 mM	DTT
4 mM	ATP
200 μ M	L-Arginin
10 μ M	[³ H]-L-Aspartat, 14,8 TBq/mol
0,87 mg/ml	Cyanophycin
0-50 μ l/Ansatz	Proteinfraktion

Die Lösungen der unmarkierten Aminosäuren wurden auf pH 8,2 titriert. Cyanophycin wurde in 0,025 M HCl gelöst eingesetzt, um auftretende Pipettierungenauigkeiten des bei pH 8,2 unlöslichen Substrates zu verringern. Zusammen mit einer 5-fach konzentrierten Stammlösung von Tris/HCl, KCl, MgCl₂, und DTT, die auf pH 8,5 titriert wurde, ergab sich ein pH-Endwert von pH 8,2 (Modifikation nach Ebert, 2001). Die Ansätze wurden für 30 min bei 28°C unter Schütteln (1000 rpm) im Thermoblock inkubiert und die Reaktion anschließend mit 1 ml kaltem *Aqua destillata* gestoppt. Die Proben wurden mittels Vakuumvielfachfiltrationseinheit durch Nitrocellulosefilter (Millipore Typ HA, Durchmesser 24 mm, Porengröße 0,45 µm) filtriert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 ml Waschlösung (50 mM Tris/HCl, pH 8,2, 2 mM EDTA) wurden die Filter in ein Szintillationsgefäß gelegt, dazu 5 ml Szintillationscocktail Roti-Szint gegeben, dann ca. 15 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext, und 60 min zur Einstellung eines möglichst stabilen Messwerts stehen gelassen. Gemessen wurde im Szintillationszählgerät (Beckman LS 6500 scintillation system). Interne Kalibrierung erfolgte durch Zugabe von in den Ansätzen verwendeten, mit Tritium markierten Aminosäuren. Der unspezifische Hintergrund der Messungen wurde teilweise durch Ansätze ohne ATP und teilweise durch Ansätze mit gekochtem Enzym (5 min) abgeschätzt und abgezogen.

2.2.5.2. Reaktionsbedingungen für die Produktanalyse über SDS-PAGE

Um die Bedingungen für eine mögliche Elongationsreaktion zu untersuchen, wurde bei Raumtemperatur (ca. 22°C) für 10-14 Stunden inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes war 125 µl, die Zusammensetzung war wie folgt:

50 mM Tris/HCl, pH 8,2
 4 mM ATP Dinatriumsalz
 20 mM MgCl₂
 8 mM KCl
 1 mM Dithiothreitol
 0,8 mM L-Aspartat und 0,4 mM L-Arginin
 ≥10 µM synthetischer Primer und
 3 µg Cyanophycin-Synthetase oder wie angegeben

Die Proben wurden anschließend mit DOC und TCA gefällt, mit Chua-Puffern versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abschnitt 2.2.4.1.).

2.2.5.3. Bedingungen für die Produktanalyse mittels MALDI-TOF-Massenspektroskopie

Für die massenspektrometrischen Analysen wurde flüchtiger Puffer verwendet. Das Gesamtvolumen war wieder 125 µl. Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung:

100 mM NH_4HCO_3 , pH 8,0
 4 mM ATP Dinatriumsalz
 20 mM MgCl_2
 8 mM KCl
 2 mM Dithiothreitol
 0,2 mM L-Aspartat oder 0,2 mM L-Arginin
 ≥ 10 µM synthetischer Primer und
 3 µg Cyanophycin-Synthetase
 Die Proben wurden anschließend lyophilisiert.

2.2.5.4. Bestimmung der Phosphorylierung von Cyanophycin durch die Cyanophycin-Synthetase

2.2.5.4.1. Bestimmung der Phosphorylierung von Cyanophycin

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden folgende Reaktionsansätze vorbereitet, L-Asp und/oder L-Arg wurden in bestimmten Ansätzen weggelassen:

17,4 µg	Cyanophycin, gereinigt, alkalibehandelt (pH 10, 1 h, 40°C), auf pH 8 titriert
4 mM	L-Asp
0,2 mM	L-Arg
50 mM	Tris/HCl pH 8,2
50 mM	KCl
20 mM	MgCl_2
2,5 mM	DTT
1 mM	γ - ^{32}P -ATP, spezifische Aktivität: 6 GBq/mmol
ca. 3 µg	Cyanophycin-Synthetase

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 28°C. Die kompletten Reaktionsansätze (s.o.) wurden durch SDS-PAGE (15% Acrylamid) bei 100 V aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 2 x 5 min mit 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8 gewaschen, dann ohne Trocknung zwischen Polyethylenfolien gelegt und danach ein Röntgenfilm für mehrere Minuten bis Stunden aufgelegt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie gefärbt, um die Menge des aufgetragenen Cyanophycins abschätzen zu können (Abschnitt 2.2.4.2.).

Teilweise wurde die Cyanophycinpräparation in Ansätzen mit Cyanophycin-Synthetase und Aspartat bzw. Arginin vorinkubiert. Hierzu wurden die Ansätze, wie in 2.2.5.2. beschrieben, über Nacht bei Raumtemperatur mit nichtradiomarkierten Substraten inkubiert, das Cyanophycin anschließend pelletiert (2 min, 14000 rpm), zweimal mit ca. 1 ml Waschpuffer gewaschen (50 mM Tris/HCl, pH 8, 2 mM EDTA), alkalibehandelt (pH 10, 1 h, 40°C), ausgefällt (pH 8,2) und in Wasser aufgenommen.

2.2.5.4.2. Bestimmung der Stabilität des gebildeten Phosphats

Die Versuche zur Untersuchung der Stabilität des phosphorylierten Cyanophycins wurden mit Hilfe von Jan Ebert (analog Ebert 2001) auf Grundlage von Duclos *et al.* (1991) durchgeführt.

Cyanophycin wurde in Abwesenheit von Aminosäuren in 5 Ansätzen zu je 20 µl wie in 2.2.5.4.1. phosphoryliert, allerdings wurde das Cyanophycin in höherer Konzentration (69,6 µg pro Ansatz) und gelöst in 0,025M HCl (beschrieben in Abschnitt 2.2.5.1.) verwendet. Die Inkubation wurde für 30 min bei 28°C und maximaler Schüttelgeschwindigkeit im Thermomixer durchgeführt.

Nach Pelletierung und einmaliger Wäsche des Phosphocyanophycins (50 mM Tris/HCl, pH 8, 2 mM EDTA) wurden die Ansätze in Ansatzpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,2, 50 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT) oder nach Suspension in Wasser unter folgenden alternativen Bedingungen für 90 min bei 37 °C und maximaler Schüttelgeschwindigkeit (Thermomixer) inkubiert:

0,8 M Hydroxylamin/ 0,1 M Essigsäure, pH 5,2

0,1 M NaOH

0,1 M HCl

0,5 M Tris/HCl pH 8,2

Anschließend wurde das Cyanophycin erneut pelletiert und mit gleichen Teilen Wasser und 2×SDS-Probenpuffer komplett in die Probentasche des 15%-Acrylamidgels überführt.

2.2.5.5. Trennung von Reaktionsprodukten durch Größenausschluss-Chromatographie an einer P2-Säule und Nachweis der Kalibranden

Um die Reaktionsprodukte der Synthetase und ihrer mutagenisierten Varianten für die Messungen der Massenspektren anzureinigen, wurde Bio-Gel P-2-Säulenmaterial (Bio-Rad, Säulengeometrie: 1 x 30 cm) verwendet. Laufmittel war 0,1 M Essigsäure. Für die Kalibrierung der Säule wurden die Aminosäure L-Aspartat ($M_W=133$ g/mol), das Dipeptid α -Arg-Asp ($M_W=289$ g/mol), reduziertes Glutathion ($M_W=307$ g/mol), ATP ($M_W=551$ g/mol, Dinatriumsalz) und Cytochrom C ($M_W=12300$ g/mol) verwendet. Kalibrierungsproben mit freier Aminogruppe wurden mittels Ninhydrinnachweis (siehe Tab. 4), Cytochrom C und ATP im Spektrophotometer (bei $\lambda=409$ nm bzw. $\lambda=259$ nm) detektiert.

Tabelle 4: Nachweis mit Ninhydrin

Ansatz	in μl
Fraktion	100
Na-Acetat-Puffer (100 mM, pH 5,3)	100
Ninhydrin-Reagenz (Sigma Aldrich)	200

Die Ansätze wurden für 15 min bei 100°C inkubiert und danach kurz zentrifugiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Ansätze mit 1 ml 50% Ethanol-Wasser (v/v) versetzt und die Absorption bei 570 nm gemessen.

Bei Reaktionsansätzen mit radiomarkierten Aminosäuren wurden 100 μ l der Fraktionen zu 2,5 ml Szintillations-Cocktail gegeben und die Radioaktivität bestimmt.

Das Ziel dieses Verfahrens war die vollständige Entsalzung der Proben. Andere Methoden, wie zum Beispiel Dialyse, hätten zum Verlust der gesuchten kleinen Peptide geführt. Ein nicht gewünschter Effekt dieser Methode war eine Fraktionierung des Reaktionsansatzes, was zur Folge hatte, dass viele Fraktionen jedes Trennungsganges vermessen werden müssen, um einen Überblick über mögliche gebildete Produkte zu bekommen.

Die Versuche wurden zuerst mit radiomarkierten Substraten durchgeführt, um herauszufinden, ob eine Produktbildung eintrat und somit die Radiomarkierung bei einer geringeren Retentionszeit eluierte.

Für Messungen mittels MALDI-MS wurden entsprechende Chromatographien nichtradioaktiv durchgeführt, die 1 ml-Fractionen Nummer 27 bis 40 lyophilisiert und vermessen.

2.2.6. Gentechnische Arbeiten

2.2.6.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche) dem Protokoll folgend durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde dann in einer entsprechenden Menge TE-Puffer (s.u.) aufgenommen.

2.2.6.2. Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA wurde in Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989) elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,8%ige bzw. 1,2%ige Gele (w/v) eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5-10 V/cm.

Laufpuffer (TE-Puffer):	45 mM Tris-Borat pH 8,5 1,8 mM EDTA
Gelkomposition	0,8% Agarose in Laufpuffer (s.o.) 0,001% Ethidiumbromid (w/v)
Ladepuffer	50% Glycerol (v/v) 1 mM EDTA, pH 8,0 0,05% Bromphenolblau (w/v) 0,05% Xylencyanol (w/v)

2.2.6.3. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegelstück mittels QIAEX II Gel Extraktions Kit (Qiagen) eluiert. Bei der Ausführung wurde das Hersteller-Protokoll befolgt.

2.2.6.4. Verdaу von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen erfolgte nach der Herstellervorschrift (BioLabs). Ansätze mit Plasmid-DNA wurden für 1-2 h inkubiert.

2.2.6.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von Plasmid-DNA wurde mit T4-DNA-Ligase (BioLabs) bei 16 °C über Nacht durchgeführt. In der Regel wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 eingesetzt.

2.2.6.6. Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 α , BL21[DE3]) wurden nach der CaCl₂-Methode (Hanahan, 1983) präpariert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 200 μ l Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 1 min 45 s einer Temperatur von 42°C ausgesetzt und erneut für 3 min auf Eis gestellt. Danach wurde 800 μ l LB-Medium zugesetzt und zur Ausbildung der Ampicillinresistenz eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Selektion erfolgte auf LB-Platten mit 125 μ g/ml Ampicillin.

2.2.6.7. Sequenzierungen

Die Sequenzierung erfolgte mit dem „Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ (ABI) nach Herstellervorgaben oder durch die Firma AGOWA Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH (Berlin).

2.2.6.8. Herstellung verschiedener *cphA*-Konstrukte

2.2.6.8.1. Ortsgerichtete Mutagenesen

Ausgangsstoff aller Klonierungen war das Expressionskonstrukt pRGL23 von Dr. Karl Ziegler. Es wurde wie folgt hergestellt: Das Gen *cphA* aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 wurde über angefügte *Nde*I/*Xho*I-Schnittstellen in pET 22b(+) (Novagen, USA) kloniert, sodass der C-terminale His₆-tag des Vektors hinter dem natürlichen Stoppcodon des Gens liegt und somit nicht exprimiert wird (Berg *et al.* 2000). Im Bereich jeder ortsgerichteten Mutagenese wurde ein möglichst kleines Stück des Gens *cphA* herausgeschnitten und in den Vektor pBluescript II SK (+) ligiert. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit Hilfe des Kits GeneEditor™ *in vitro* Site Directed Mutagenesis System genau nach dem Herstellerprotokoll der Firma

Promega durchgeführt. Die Daten zu den Mutationen und verwendete Primer sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tabelle 5: Dokumentation der Orte der Mutagenesen, der verwendeten Abschnitte des Gens *cphA* sowie der verwendeten Primer

Mutation	Fragm. pRGL23	Primer	neue Restriktions-site
Lys261Gly	<i>SpeI/KpnI</i> (220 bp)	WL154	<i>ApaI</i>
Glu298Ala	<i>SpeI/KpnI</i> (220 bp)	WL161	<i>BssHII</i>
Asn392Asp	<i>SpeI/EagI</i> (526 bp)	WL162	<i>PstI</i>
Lys497Ala	<i>SnaBI/EagI</i> (826bp)	WL153	<i>NarI</i>

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dokumentiert.

Das mutierte Segment wurde in das Plasmid pRGL23 zurückligiert. Der Erfolg der Mutation wurde in allen Fällen durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen und zusätzlicher Sequenzierung des entsprechenden Bereichs bestätigt.

2.2.6.8.2. Umklonierung von *cphA* in den Vektor pET-19b

Das von Ziegler bezogene Plasmid pRGL 23 (Abschnitt 2.2.6.8.1.) wurde an den angefügten *NdeI*- und *XhoI*-Schnittstellen mit entsprechenden Enzymen geschnitten und das gesamte Gen *cphA* in den Vektor pET-19b (Novagen) ligiert. N-terminal wurde so eine 10 Histidinreste codierende Sequenz über ein Linkerpeptid in den Leserahmen integriert. Das natürliche Stoppcodon des Gens blieb erhalten.

2.2.6.8.3. Konstruktion und Expression von separat exprimierten *cphA*-Bereichen

Separat exprimierte N- bzw. C-Bereiche der Cyanophycin-Synthetase wurden wie folgt hergestellt: Beide Bereiche wurden mit Taq-Polymerase über die in Tabelle 6 angegebenen Primer amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und nach Elution aus dem Gel in den Vektor pGEM-T ligiert. Das *cphA* enthaltende Plasmid wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und diese Zellen anschließend auf LB-Agar-Platten (Amp(100 μ g/ml), Xgal, IPTG) ausplattiert.

Die *cphA*-pGEM-T-Konstrukte wurden an den in Tabelle 6 angegebenen, teilweise neu eingeführten, Restriktionsschnittstellen mit den entsprechenden Endonucleasen geschnitten. Die Inserts wurden durch Agarosegelelektrophorese

abgetrennt, aus dem Gel eluiert und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen, ebenfalls gereinigten Expressionsvektor pET-19b ligiert.

Tabelle 6: Daten zur Konstruktion der N- bzw. C-Bereichen. Primersequenzen gehen aus Tabelle 3 hervor

Bereich	Aminosäuren	Benutzte Primer	Restriktionsschnittstellen
N-Bereich	Aminosäure 1-447	WL 96, WL 226	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>
C-Bereich	Aminosäure 429-901	WL 141, WL 92	<i>NdeI</i> , <i>XhoI</i>

2.2.6.8.4. Konstruktion einer Deletion im N-Bereich (ΔN)

Das Gen *cphA* in dem Konstrukt pRGL23 (siehe Abschnitt 2.2.6.8.1.) wurde mit den Restriktionsendonucleasen *NdeI* und *XhoI* aus dem Vektor geschnitten, gereinigt und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen und anschließend gereinigten Vektor pET-19b ligiert, sodass N-terminal eine His₁₀-tag codierende Sequenz zusätzlich exprimiert wurde. Dieses Konstrukt zur Expression des Wildtyp-Gens und des His₁₀-tags wurde mit *KpnI* und *SpeI* geschnitten und das 8,4 kbp große Fragment nach Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Der 3'-Überhang wurde mit Klenow-Enzym abgeschnitten. Das 5'-Ende des Fragmentes wurde mit Klenow-Enzym aufgefüllt und beide Enden mit sich selbst ligiert (Tab. 7).

2.2.6.8.5. Konstruktion einer Deletion im C-Bereich (ΔC)

Das wie in 2.2.6.8.3. präparierte His₁₀-Wildtyp-Konstrukt in pET-19b wurde mit den Restriktionsenzymen *EagI* und *SnaBI* geschnitten und das erhaltene 7,8 kbp-Fragment nach Agarosegelelektrophorese isoliert. Das 5'-Ende des Fragments wurde mittels Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend beide Enden miteinander ligiert.

Tabelle 7: Daten zur Konstruktion deletierter Cyanophycin-Synthetasen

Deletionsmutante	Deletion	Benutzte Restriktionsenzyme
ΔN -Mutante	Aminosäure 233-307	<i>KpnI</i> / <i>SpeI</i>
ΔC -Mutante	Aminosäure 482-758	<i>EagI</i> / <i>SnaBI</i>

3. Ergebnisse

3.1. Fragestellung und Lösungsansätze

Bis auf wenige Ausnahmen können alle Cyanobakterien, eine unbekannte Zahl anderer Eubakterien sowie Organismen, bei denen die Cyanophycin-Synthetase heterolog exprimiert wird, Cyanophycin im Cytoplasma akkumulieren. Diese *in vivo*-Akkumulation führt zu einer Bildung von teilweise mehr als 10% Cyanophycinanteil am Trockengewicht. Die von mir untersuchte, heterolog in *E. coli* (BL21[DE3]) exprimierte Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 bildete Cyanophycin, d.h. es wurden große Mengen des Polymers als unlösliche Granula gebildet. Identische Ergebnisse bei heterologer Expression anderer Cyanophycin-Synthetasen in verschiedenen Organismen erzielten Aboulmagd *et al.* (2001). Die Molmasse des Cyanophycins beträgt in Cyanobakterien zwischen 25 kDa und 100 kDa, bei heterologer Expression liegt sie zwischen 25 kDa und 30 kDa.

Nicht untersucht wurde bisher der Mechanismus der Synthese, d.h. die Richtung der Polymerverlängerung, die Reihenfolge des Substrateinbaus und der Ablauf der Kondensationsreaktion zwischen den Aminosäuren. Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptide erlaubten erstmalig eine qualitative Untersuchung dieser bislang ungeklärten Fragestellungen. Zusätzlich konnten mit Hilfe dieser Peptide bekannte Ergebnisse zur Substratspezifität der Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* ATCC 29413 bestätigt und ergänzt werden. Mittels ortsgerichteter Mutagenese der Cyanophycin-Synthetase konnte zudem eine Zuordnung zwischen Bereichen des Enzyms und Teilschritten seiner katalytischen Funktion erreicht werden.

3.1.1. *In vitro*-Synthese von Cyanophycin

Bei *in vitro*-Inkubation der Cyanophycin-Synthetase mit synthetischen Primern und den konstituierenden Aminosäuren Aspartat und Arginin, ATP, Mg^{2+} - und K^{+} -Ionen, sowie einem Thiolreagenz wie Dithiothreitol oder Mercaptoethanol wurde eine Bildung von Cyanophycin im Größenbereich von 25 kDa bis 30 kDa beobachtet, das heißt mit der gleichen Molmasse wie bei Expression der Synthetase in *E. coli*. Ohne Primer konnte keine *in vitro*-Synthese von Cyanophycin festgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit bislang allen veröffentlichten Arbeiten zur biochemischen Charakterisierung verschiedener Cyanophycin-Synthetasen (siehe Abschnitt 1.7.).

Abschätzungen der Menge des gebildeten Produktes ergaben, dass nie mehr Cyanophycinmoleküle als eingesetzte Primermoleküle gebildet wurden. Es gelang also *in vitro* lediglich eine Elongation und keine *de novo*-Synthese. *In vivo* kann jedoch auch durch heterologe Expression von Cyanophycin-Synthetasen in mehreren Organismen Cyanophycin gebildet werden (Tab. 2, Abschnitt 1.7.). Ob ein Primer, der in mehreren nicht verwandten Organismen vorkommt, existiert oder ob die gewählten Synthesebedingungen *in vitro* möglicherweise nicht denen *in vivo* entsprechen, bleibt ungeklärt. Die Zugabe des Überstandes eines Rohextraktes von *E. coli* DH5 α , *Anabaena variabilis* oder einer in der Aktivität der Cyanophycin-Synthetase (CphA) defizienten Mutante von *Anabaena variabilis* (freundliche Gabe von Dr. Karl Ziegler) führte zu keiner Cyanophycinbildung (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2. Versuche, die CphA-Anreicherung zu optimieren

Es wurde versucht Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* in *E. coli* (BL21[DE3]) über andere Reinigungsmethoden effektiver zu reinigen. Weder hydrophobe Interaktionschromatographie (Methyl-, Octyl- und Phenylsepharose (keine Bindung bei mit 1M (NH₄)₂SO₄ ergänztem Puffer), Hydroxyapatit-Säulenmaterial (Elution mit Phosphatgradient), DEAE-Cellulose, noch Arginin- oder Aspartat-Agarose-Säulenmaterial (Elution mit entsprechendem Aminosäuregradient) erwiesen sich als nützlich (Ergebnisse nicht gezeigt). Für Versuche mit der Wildtyp-Synthetase wurde anschließend mit pET19b-Konstrukten gearbeitet, da die N-terminal zusätzlich exprimierten zehn Histidinreste eine sehr einfache Anreinigung durch Bindung an Nickel-NTA-Agarose und anschließende fraktionierte Elution mit Imidazol ermöglichten. Der überwiegende Anteil der Synthetase eluierte bei Imidazolkonzentrationen zwischen 200 und 500 mM. Punktmutierte Cyanophycin-Synthetasen (Abschnitte 3.7. bis 3.9.) wurden als pET-22b-Konstrukte eingesetzt. Qualitative biochemische Unterschiede zwischen pET-19b- und pET-22b-Konstrukt (Abschnitt 2.2.6.8.1., Expression ohne His₁₀-tag) wurden nicht gefunden.

3.3. *In vitro*-Elongation mit Hilfe synthetischer Primer

Unter Annahme der in Abbildung 2 (Abschnitt 1.1.) gezeigten verzweigten Struktur des Cyanophycins stellt sich die Frage nach der Richtung der Polymerverlängerung. Für die Untersuchung der Richtung der Elongationsreaktion und um ein einheitliches

Substrat für Einbauversuche zur Verfügung zu haben, wurden die in Abbildung 5 gezeigten Primer synthetisiert:

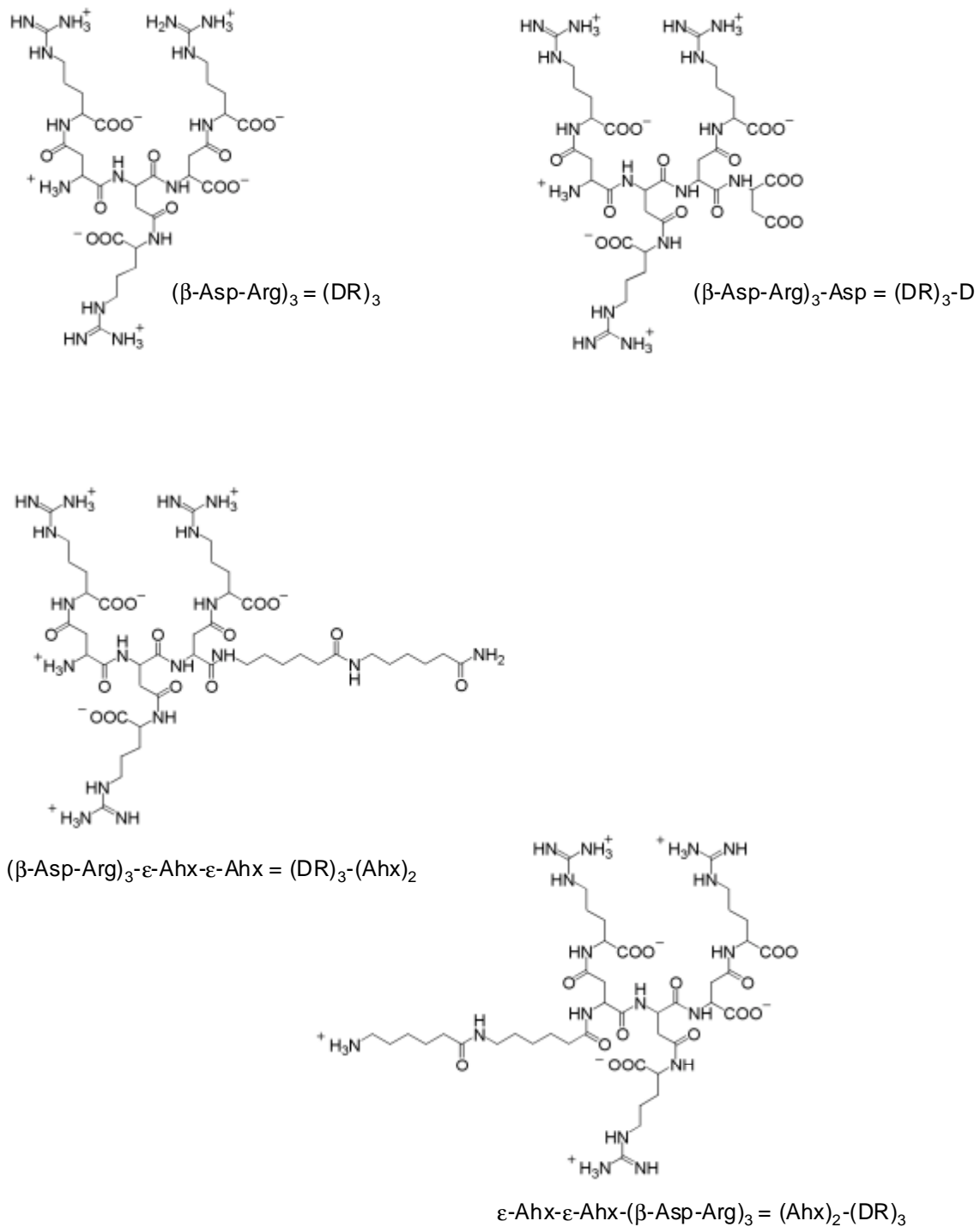


Abbildung 5: synthetische Primer

Ahx: 6-Aminohexansäure

Die Verbindungen $(DR)_3$ und $(DR)_3$ -D sind zwei kurze Cyanophycinmoleküle, die Verbindungen $(DR)_3$ -(Ahx)₂ und (Ahx)₂-(DR)₃ sind C- bzw. N-terminal durch eine jeweils aus zwei Molekülen 6-Aminohexansäure (Ahx) bestehende Schutzgruppe blockiert.

3.4. Test verschiedener Peptide als Aminosäuresubstrat bzw. Primer

Abbildung 6 zeigt, dass der Einsatz des synthetischen Primers $(DR)_3$ zur Bildung eines Polymers mit einer Größe zwischen 25 kDa und 30 kDa führte, also der gleichen Größenverteilung wie die des Polymers, das *in vivo* von der heterolog in *E. coli* exprimierten Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* gebildet wird (Abb. 6, Spur 1). Die Wirksamkeit des synthetisierten verzweigten Peptides als Primer ist ein Beleg dafür, dass die Struktur dieses Primers dem Aufbau von Cyanophycin ähnlich sein könnte (vergleiche identischer Aufbau der Strukturen in Abb. 2. und 5., Abschnitt 1.1. und 3.3). Ansätze ohne Primer oder ohne eines der Substrate führten nicht zu einer Polymerbildung (Abb. 6, Spuren 2 bis 5).

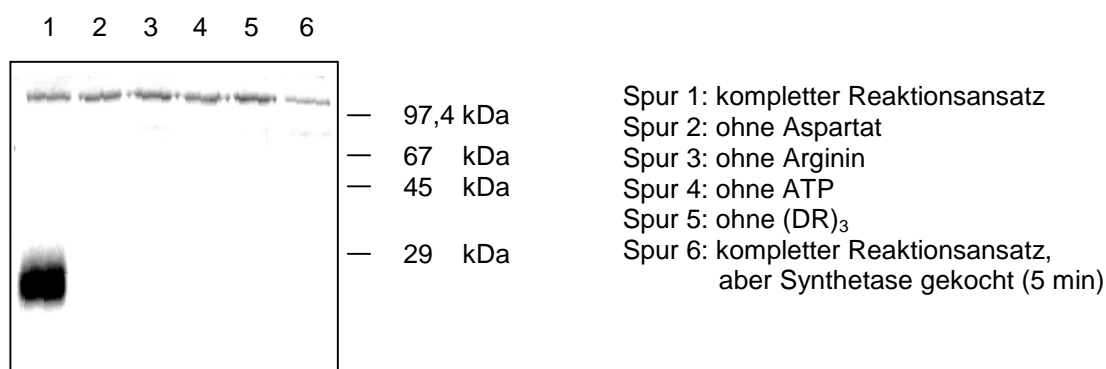


Abbildung 6: Test des Peptides $(DR)_3$ als Primer, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Es wurden ca. 10 μ M des synthetischen Primers $(DR)_3$ mit gereinigter Synthetase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Es wurden 2 μ g Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa).

Um die Elongationsrichtung festzustellen, wurden Versuche mit N-, bzw. C-terminal blockierten Primern durchgeführt. Die Abbildung 7 zeigt, dass eine Blockierung des C-Terminus des Primers die Elongation verhindert, eine Blockierung des N-Terminus jedoch nicht. Die Elongation vollzieht sich also durch Aktivierung der Carboxylgruppe, in Übereinstimmung mit den aufgeklärten Reaktionen strukturell verwandter Enzyme wie D-Alanin: D-Alanin Ligase aus *E.coli* (Fan *et al.*, 1995) oder MurC (Bouhss *et al.* 1997) und MurD (Bertrand *et al.* 1997).

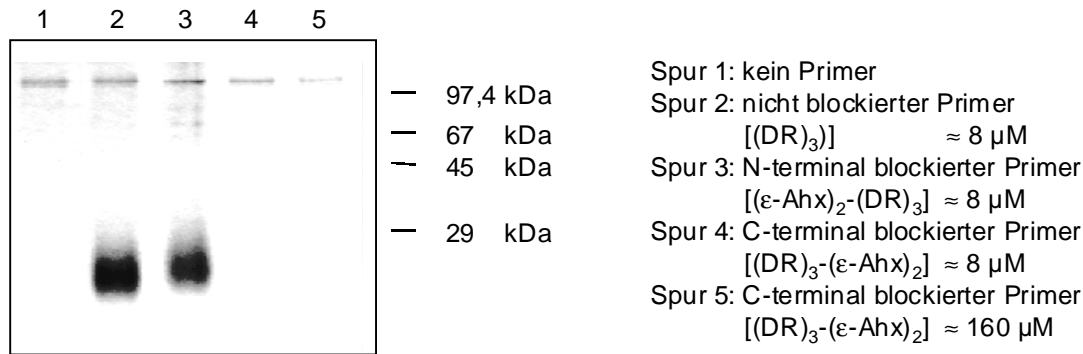


Abbildung 7: Elongationsansätze unter Verwendung C- oder N-terminal blockierter Peptide als Primer, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Verschiedene Primer wurden mit einem ansonsten vollständigen Reaktionsansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 2 μg Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa).

Desweiteren wurde das Peptid $(DR)_3$ -D und das Dipeptid β -Asp-Arg auf Wirkung als Primer bzw. als Substrat untersucht:

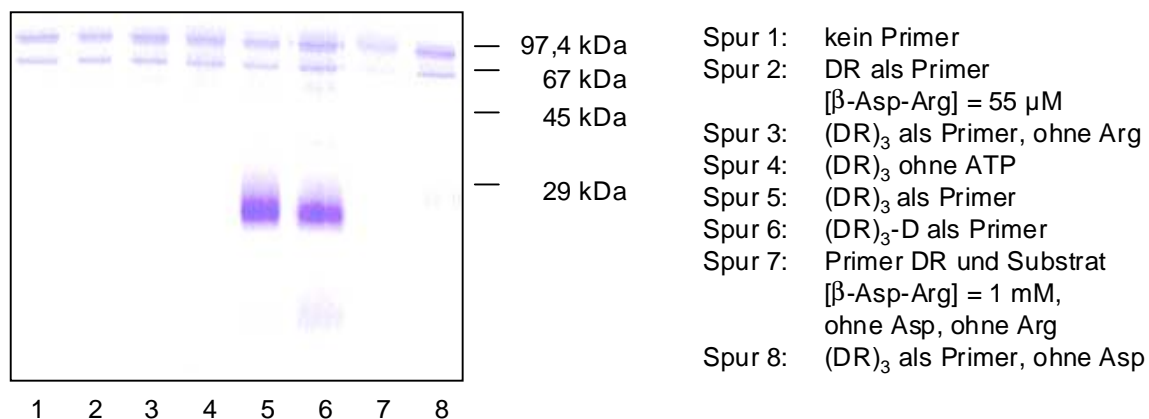


Abbildung 8: Test des Primers $(DR)_3$ -D und Test des Dipeptides β -Asp-Arg als Primer und als Substrat, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Die Abbildung 8 zeigt weitere Versuche mit verschiedenen Peptiden als Primer. Die Proteinbande bei ca. 65 kDa ist vermutlich ein Abbauprodukt der Synthetase und beeinträchtigt nicht ihre biochemische Aktivität. Es wurden 2 μg Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa).

Die Abbildung 8 belegt, dass sowohl $(DR)_3$ (Spur 5) als auch $(DR)_3$ -D (Spur 6) biochemische Aktivität als Primer besitzen. Das Dipeptid β -Asp-Arg wurde jedoch weder als Primer (Spur 2), noch als Substrat anstelle von Aspartat und Arginin (Spur 7) akzeptiert.

Zur Klärung der Frage, ob β -Asp-Arg in höherer Konzentration und in Kombination mit Primer $(DR)_3$ eine Elongation bewirkt, wurden erneut mehrere Ansätze untersucht (Abb. 9).

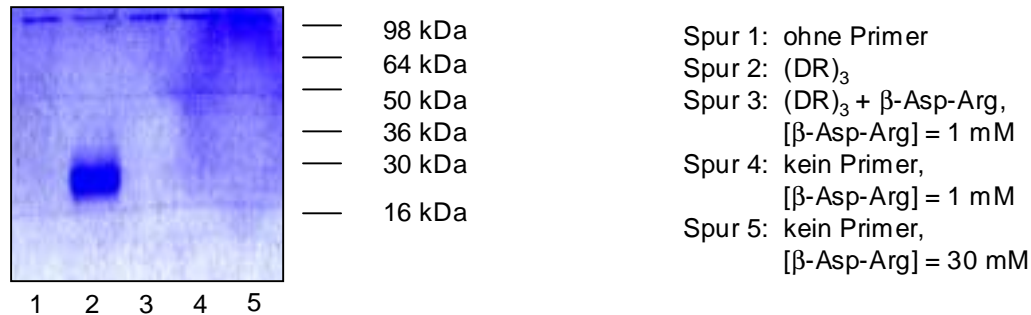


Abbildung 9: Test des Dipeptids β -Asp-Arg als Aminosäuresubstrat, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

SDS-PAGE: Reaktionsansätze unter Verwendung erhöhter β -Asp-Arg-Konzentrationen, $[(DR)_3] = 35 \mu\text{M}$, $[\text{Asp}] = 0,8 \text{ mM}$, $[\text{Arg}] = 0,4 \text{ mM}$, Asp und Arg waren nur in den Ansätzen 1 und 2 enthalten. Es wurden $2 \mu\text{g}$ Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa).

Die Kombination aus Primer $(DR)_3$ und Substrat β -Asp-Arg führte ebenfalls nicht zur Bildung des Polymers (Abb. 9, Spur 3).

Weiterhin wurden andere Dipeptide, die entweder eine Peptidbindung oder eine Isopeptidbindung enthalten, auf ihre Wirkung als Primer untersucht (Abb. 10). Keines der untersuchten Dipeptide wirkte als Primer.

Um zu überprüfen, ob ein Faktor mit Primerwirkung mitgereinigt wurde, ist die Synthetase in höherer Menge eingesetzt worden (Abb. 10, Spuren 13 und 14). Die Spuren 13 und 14 zeigen keine andere Proteinbande als die der Cyanophycin-Synthetase. Eine erhöhte Menge eingesetzter Synthetase bzw. möglicher anhaftender Faktoren führte nicht zu einer erkennbaren Bildung von Cyanophycin. Offenbar enthielt die Synthetase-Präparation keine Moleküle, die als Primer der Elongationsreaktion dienen könnten.

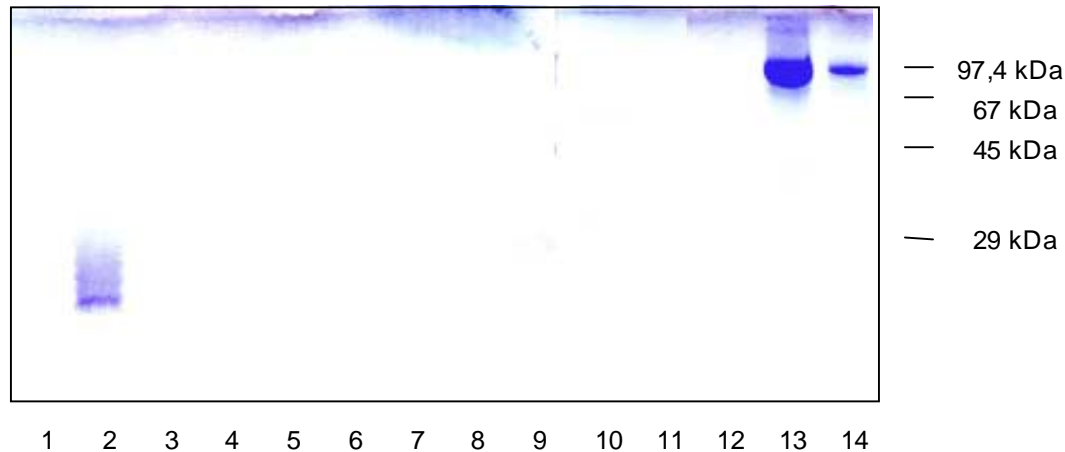


Abbildung 10: Test verschiedener Dipeptide und hoher Synthetasekonzentrationen, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Spur 1: kein Primer,
keine Aminosäuren
Spur 2: (DR)₃
Spur 3: β-Asp-Ala
Spur 4: γ-Glu-Leu

Spur 5: β-Asp-Phe
Spur 6: β-Asp-Gly
Spur 7: β-Asp-Lys
Spur 8: Enzym gekocht
Spur 9: β-Asp-Leu

Spur 10: β-Asp-His
Spur 11: α-Asp-Arg
Spur 12: α-Arg-Asp
Spur 13: 30fache Enzymkonz.
Spur 14: 10fache Enzymkonz.

Die Dipeptide wurden in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt, der Primer in einer Konzentration von ca. 14 μM, die Menge eingesetzter Cyanophycin-Synthetase betrug 0,5 μg pro Ansatz (Ausnahmen: Spuren 13 und 14, Proteinbande bei ca. 100 kDa).

3.5. Abfolge des Einbaus der Aminosäuresubstrate

Unter Annahme einer einheitlichen Struktur des Cyanophycins und aufbauend auf die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4. (C-terminale Verlängerung) ergeben sich drei Möglichkeiten der Kettenverlängerung:

- sukzessiver Einbau der einzelnen Aminosäuren oder
- Verknüpfung von Aspartat und Arginin zum Isopeptid β-Aspartyl-Arginin mit anschließender Verknüpfung von Polymer und Dipeptid oder
- C-terminale Verlängerung durch zwei oder mehr Aspartatreste und anschließende Bindung der Argininreste.

Zur Überprüfung der oben genannten Möglichkeiten wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

Zu ansonsten kompletten Reaktionsansätzen mit synthetischem Primer wurden nur die radioaktiv markierten Aminosäuren [³H]-Aspartat oder [³H]-Arginin eingesetzt und das Reaktionsgemisch anschließend an einer Biogel P2-Säule aufgetrennt, um anhand einer Kalibrierung der Säule ein möglicherweise

entstehendes Produkt finden und seine Größe abschätzen zu können (siehe Abschnitt 2.2.5.5.).

Für eine Produktanalyse durch MALDI-MS wurden Reaktionsansätze unter Verwendung nichtmarkierter Substrate in dem flüchtigen Ammoniumbicarbonat-Puffersystem präpariert. Die Ansätze wurden nach Lyophilisation und Aufnahme in dem Laufmittel (0,1 M Essigsäure) anschließend ebenfalls über eine Biogel-P2-Säule aufgetrennt. Die Verwendung eines flüchtigen Puffersystems und die Auftrennung an der P2-Säule hatte die Funktion, die Proben von Salzen, die in der MALDI-Massenspektroskopie stören, zu reinigen.

Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 11 dargestellt. Es wurden verschiedene Kombinationen aus Primer und Aminosäuresubstrat eingesetzt.

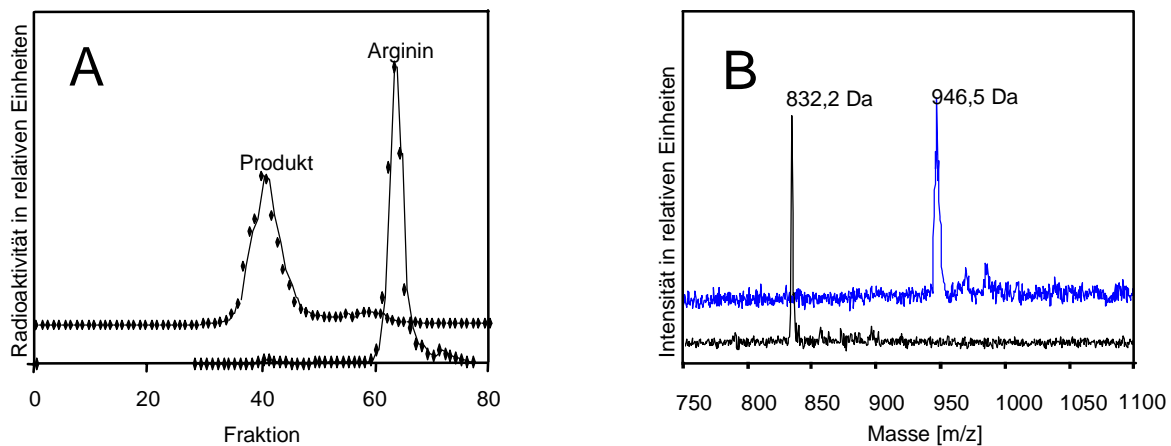


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Analysen mittels P2-Säule und MALDI-MS. Die Baselinien wurden der Klarheit halber gegeneinander versetzt.

Abbildung 11A zeigt die Gelfiltrationsanalyse von Ansätzen vor und nach einer Reaktion von $[^3\text{H}]$ -Asp mit Primer $(\text{DR})_3$. Das Produkt $(\text{DR})_3$ - $[^3\text{H}]$ -Asp fand sich in den Fraktionen 35 bis 45, mit der höchsten Konzentration in Fraktion 40. Das Elutionsvolumen des Produktes entspricht einer Masse von ca. 1000 Da. Abbildung 11B zeigt die Masse des Primers $(\text{DR})_3$ (berechnete mittlere Molmasse $M+\text{H}^+=832,8$ Da) vor einer Reaktion, sowie des Produktes $(\text{DR})_3$ -D (berechnete mittlere Molmasse $M+\text{H}^+=947,9$ Da) nach Reaktion mit Aspartat. In Abschnitt 3.6. sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst (Tab. 8). Eine Berechnung der Molmassen verschiedener Peptide findet sich im Anhang (Abschnitt 6.1.).

3.6. Substratspezifität der Cyanophycin-Synthetase

Die von Simon & Weathers (1976), Simon *et al.* (1980) und Hejazi (2002) vorgeschlagene Grundstruktur von Cyanophycin ist unstrittig. Über die Anteile und Art der konstituierenden Aminosäuren hingegen finden sich aber verschiedene Angaben (Abschnitt 1.2.).

Untersuchungen mittels der hier verwendeten massenspektrometrischen Methode sowie Auftrennung von radioaktiven Produkten ergaben die in Tabelle 8 und 9 aufgeführten Ergebnisse. Die Dokumentation der MALDI-Massenspektren findet sich im Anhang in Abschnitt 6.2.. Eine Erläuterung und Diskussion wird in Abschnitt 6.2.3. gegeben.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Aufklärung der Elongations-
richtung: Reaktionsansätze mit verschiedenen Primern

Nr.:	Primer	Substrat	Produkt	Referenz
C-terminal blockierter Primer:				
1	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-(}\epsilon\text{-Ahx)}_2$	Asp + Arg	kein Polymer	Abb. 7, Spuren 4,5
2	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-(}\epsilon\text{-Ahx)}_2$	Asp	kein Produkt	Spekt. 4, Anh. 6.2.1.
N-terminal blockierter Primer:				
3	$(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(}\beta\text{-Asp-Arg})_3$	Asp + Arg	Cyanophycin	Abb. 7, Spur 3 Spekt. 15, Anh. 6.2.1.
4	$(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(}\beta\text{-Asp-Arg})_3$	Asp	$(\epsilon\text{-Ahx})_2\text{-(}\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$	Spekt. 2, Anh. 6.2.1.
Unblockierte Primer:				
5	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3$	Asp + Arg	Cyanophycin	Abb. 6, Spur 1 Abb. 7, Spur 2
6	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3$	Asp	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$	Spekt. 6, Anh. 6.2.1.
7	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3$	Arg	kein Polymer	Abb. 6, Spur 2
8	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3$	$\beta\text{-Asp-Arg}$	kein Polymer	Abb. 9, Spur 3
9	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$	Asp + Arg	Cyanophycin	Abb. 8, Spur 6
10	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$	Asp	kein Produkt	Spekt. 7, Anh. 6.2.1.
11	$(\beta\text{-Asp-Arg})_3\text{-Asp}$	Arg	$(\beta\text{-Asp-Arg})_4$	Spekt. 8, Anh. 6.2.1.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Substratspezifität

Nr.:	Primer	Substrat	Produkt	Referenz
1	(DR) ₃ -D	Orn	(DR) ₃ -(D-Orn)	Spekt. 12, Anh. 6.2.1.
2	(DR) ₃ -D	Cit	(DR) ₃ -(D-Cit)	Spekt. 13, Anh. 6.2.1.
3	(DR) ₃ -D	Lys	(DR) ₃ -(DK)	abgeleitet aus Spekt. 11, Anh. 6.2.1.
4	(DR) ₃ -(DK)	Asp	(DR) ₃ -(DK)-Asp	Spekt. 11, Anh. 6.2.1.
5	(DR) ₃	Glu	kein Produkt	Spekt. 10, Anh. 6.2.1.

MALDI-MS-Spektren sind im Anhang dokumentiert (Abschnitt 6.2.).

Die Ergebnisse der MS-Messungen sind rein qualitativ. Abbildung 12 zeigt, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen nur bei Anwesenheit der beiden typischen Substrate Aspartat und Arginin für die Färbung ausreichende Mengen eines Polymers entstanden, obwohl verschiedene basische Aminosäuren mit dem Primer (DR)₃-D verknüpft werden können (Tab. 9). Mögliche Erklärung dafür ist entweder eine geringe Substrataffinität oder eine Hemmung der Synthese im Verlauf einer Elongation mit den untersuchten Substraten. Wie Tabelle 9 (Zeile 4) zeigt, erfolgt aber zumindest im Falle des eingesetzten Lysins kein absoluter und sofortiger Abbruch der Synthese.

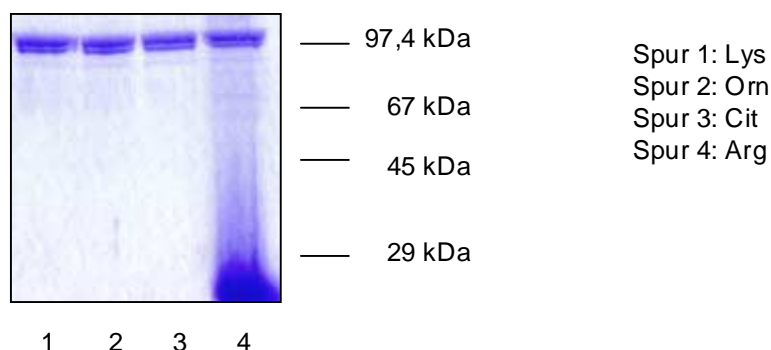


Abbildung 12: *In vitro*-Elongationsansätze mit den anstelle von Arginin eingesetzten Aminosäuren Lysin, Ornithin, und Citrullin, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Es wurden 2 µg Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa). Alle Ansätze enthielten ca. 10 µM (DR)₃-D als Primer und jeweils 1,6 mM Aspartat und 1,6 mM der basischen Aminosäure.

Merritt *et al.* (1994) und Wingard *et al.* (2002) fanden Glutamat als Bestandteil von Cyanophycin aus *Synechocystis* PCC 6308 bzw. *Synechococcus* sp. strain G2.1. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Einbau von Glutamat anstelle von Aspartat durch die *Anabaena*-Synthetase nicht gezeigt werden.

3.7. Struktur der Cyanophycin-Synthetase

Sequenzvergleiche mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.* 1990, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zwischen der Cyanophycin-Synthetase CphA und Proteinsequenzen der Datenbanken zeigten eine Ähnlichkeit des C-terminalen Bereiches zu einer Superfamilie von Ligasen, der Mur-Ligasen und Folyl-Poly- γ -Glutamat-Ligase angehören. Der N-terminale Bereich dagegen wies Ähnlichkeit zu Ligasen der ATP-grasp-Superfamilie auf (Berg *et al.* 2000).

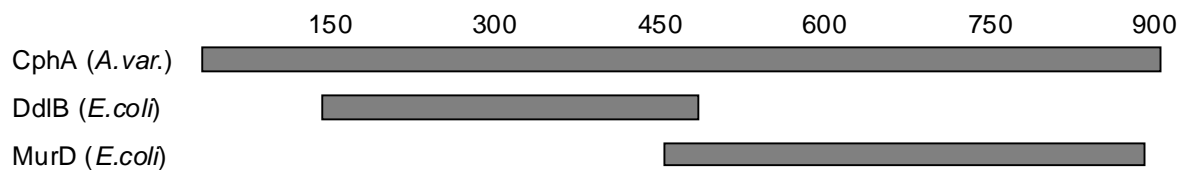


Abbildung 13: Stark schematisierter Sequenzvergleich zwischen Cyanophycin-Synthetase (*A. variabilis*) mit anderen Proteinsequenzen

CphA: Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413

DdlB: D-Alanin:D-Alanin-Ligase aus *E. coli*

MurD: UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanin:D-Glutamat-Ligase aus *E. coli*

Zahlenwerte bezeichnen Aminosäurereste nach Nummerierung bei CphA (*A. variabilis*), Sequenzvergleich durchgeführt mit BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Die Sequenzvergleiche lassen auf eine aus zwei Bereichen bestehende Struktur schließen (Ziegler *et al.* 1998, Berg *et al.* 2000, Aboulmagd *et al.* 2000). Es existieren in einigen bakteriellen Genomen DNA-Sequenzen, die dem Cyanophycin-Synthetase-Gen *cphA* ähnlich sind (Krehenbrink *et al.* 2002, Ziegler *et al.* 2002). Das putative Expressions-Produkt dieser *cphA'* genannten Gene ist aber teilweise verkürzt (C-terminale Verkürzung bei *cphA'* aus *Nitrosomonas europaea* sp. ATCC 25978 und *Anabaena* sp. PCC 7120) oder es fehlen charakteristische Motive wie „J-loop“ (*Bordetella pertussis* sp. Tohama I und *N. europaea*) oder „P-loop“ (*Anabaena* PCC 7120). Über die Funktion von CphA' ist noch nichts bekannt.

In *Chlamydia muridarum*, *Chlamydophila pneumoniae* CWL029 und *Chlamydia trachomatis* existieren Gene mit einer umgekehrten Organisation. Der N-terminale Bereich hat Ähnlichkeit zu Mur-Ligasen, der C-terminale Bereich besitzt Ähnlichkeit zu der D-Ala:D-Ala-Ligase. Über die Funktion dieser möglicherweise bifunktionellen Proteine ist ebenfalls noch nichts bekannt.

In Übereinstimmung mit der Struktur von Cyanophycin (Abb. 2, Abschnitt 1.1.), die durch zwei chemisch verschiedene Peptidbindungen

charakterisiert ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, die zwei vermuteten ATP-Bindungsstellen durch ortsgerichtete Mutagenese einzeln zu deaktivieren, um die Aktivitäten des jeweils intakten Bereichs separat studieren zu können. Ausschlaggebend für die Auswahl der Position der durch Mutationen veränderten Aminosäurereste war die durch Sequenzvergleich vorhergesagte Funktion für die ATP-Bindung (Zitate in der Tab. 10), sowie die völlig konservierte Lage innerhalb einer stark konservierten Region der verschiedenen Cyanophycin-Synthetasen (siehe Sequenzvergleich in Abschnitt 6.3.1.).

In Tabelle 10 sind die durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen (durchgeführt wie in Abschnitt 2.2.6.8.1. beschrieben), sowie Ergebnisse zu Funktion und intramolekularer Lage der jeweiligen vergleichbaren Aminosäurereste bei Proteinen der „ATP-grasp“-Superfamilie und der Superfamilie der Mur- und Folyl-Poly- γ -glutamat-Ligasen aufgeführt:

Tabelle 10: Punktmutationen und Lage der Aminosäurereste im aktiven Zentrum verwandter Enzyme, bei denen die räumliche Struktur aufgeklärt wurde

Mutation	Verwandte Enzyme	Vermutete Funktion	Literatur
K261G	„ATP-grasp“ Superfamilie	elektrostatische Wechselwirkungen mit den α - und β -Phosphaten, bzw. N-7 des Adenins von ADP, d.h. teilweise Neutralisierung der negativen Ladungen durch die positiv geladene Aminogruppe des ϵ -Lysinrestes, konserviert in mehreren Enzymen der „ATP-grasp“ Superfamilie, direkt vor dem B-loop gelegen	Fan <i>et al.</i> 1995&1997, Esser <i>et al.</i> 1998, Thoden <i>et al.</i> 1999, Berg <i>et al.</i> 2000, Sloane <i>et al.</i> 2001
E298A	„ATP-grasp“ Superfamilie	Wasserstoffbrückenbindung mit N6-Aminogruppe des Adenins	Fan <i>et al.</i> 1995, 1997, Esser <i>et al.</i> 1998
N392D	„ATP-grasp“ Superfamilie	über Mg^{2+} mit Phosphatgruppe des ATP koordiniert, teilweise konserviert in ATP-grasp-Enzymen, direkt vor dem J-loop gelegen	Fan <i>et al.</i> 1995, 1997, Thoden <i>et al.</i> 1999, Blanchard <i>et al.</i> 1999

Fortsetzung Tabelle 10:

K497A	Superfamilie der Mur- und Folyl-Poly- γ -glutamat-Ligasen	Teil des P-loop. Dieser Lysinrest wechselwirkt mit dem α - und β -Phosphat des ADP und könnte stabilisierend auf die Bildung eines möglichen intermediären Acylphosphats wirken. Außerdem wird aufgrund kinetischer Daten eine erhebliche Bedeutung für den katalytischen Prozess postuliert.	Toy <i>et al.</i> 1994, Eveland <i>et al.</i> 1997, Deyrup <i>et al.</i> 1998, Bertrand <i>et al.</i> 1997, 1999, Bouhss <i>et al.</i> 1999
-------	------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die mutierten Gene der Cyanophycin-Synthetase wurden auf die mit der Mutation eingeführten Endonuclease-Restriktionsschnittstellen untersucht und der mutierte Bereich sequenziert (Tab. 11).

Tabelle 11: verwendete Primer und Ergebnisse der Mutagenesen

Ortsgerichtete Mutagenese		Sequenz
K261G	Basensequenz im Wildtyp-Gen (nt 769 bis 795)	5' - CCGATTGTCATCAAGCCCCTAGATGGC -3'
	verwendetes Oligonucleotid (WL 154)	5' - CCGATTGTCATC <u>GG</u> CCCCTAGATGGC -3'
	Ergebnis der Sequenzierung	5' - CCGATTGTCATC <u>GG</u> CCCCTAGATGGC -3'
	Aminosäuresequenz nativ (AS 257 bis 265)	P I V I K P L D G
	Ergebnis der Sequenzierung	P I V I <u>G</u> P L D G
E298A	Basensequenz im Wildtyp-Gen (nt 879 bis 911)	5' - GTCAATCATTGTTGAGCGATATTACGTTGGGCG -3'
	verwendetes Oligonucleotid (WL 161)	5' - GTCAATCATTGTTG <u>CGCG</u> TATTACGTTGGGCG -3'
	Ergebnis der Sequenzierung	5' - GTCAATCATTGTTG <u>CGCG</u> TATTACGTTGGGCG -3'
	Aminosäuresequenz nativ (AS 294 bis 304)	S I I V E R Y Y V G R
	Ergebnis der Sequenzierung	S I I V <u>A</u> R Y Y V G R
N392D	Basensequenz im Wildtyp-Gen (nt 1156 bis 1188)	5' - TATTTAAGGGCAACCGCCAACCTGAGTACAGGT -3'
	verwendetes Oligonucleotid (WL 162)	5' - TATTTAAGGGCAACT <u>GCAG</u> CCCTGAGTACAGGT -3'
	Ergebnis der Sequenzierung	5' - TATTTAAGGGCAACT <u>GCAG</u> ACCTGAGTACAGGT -3'
	Aminosäuresequenz nativ (AS 386 bis 396)	Y L R A T A N L S T G
	Ergebnis der Sequenzierung	Y L R A T A <u>D</u> L S T G
K497A	Basensequenz im Wildtyp-Gen (nt 1474 bis 1503)	5' - ACCGGCACTAACGGTAAAACCACCACTACC -3'
	verwendetes Oligonucleotid (WL 153)	5' - ACCGGCACTAACGG <u>GCC</u> ACCACCACTACC -3'
	Ergebnis der Sequenzierung	5' - ACCGGCACTAACGG <u>GCC</u> ACC <u> </u> ACTACC -3'
	Aminosäuresequenz nativ (AS 492 bis 501)	T G T N G K T T T T
	Ergebnis der Sequenzierung	T G T N G <u>A</u> T <u> </u> T T

Sequenzänderungen sind jeweils unterstrichen

Die Mutation N392D war als N392A geplant, anscheinend hatte eine Transversion des Cytosins zu Adenin stattgefunden. Die Mutation K497A fand statt, führte jedoch

zu einer Verkürzung um ein Basentriplett. Möglicherweise hatte das repetitive Codon „ACC“ während der Mutagenese durch falsche Bindung des Oligonucleotides an den nichtcodierenden Strang der denaturierten Plasmid-DNA-Matrize oder eine fehlerhafte Oligonucleotidsynthese diesen Fehler verursacht.

Keines der mutierten Enzyme bildete *in vivo* Cyanophycin. Aktivitätsmessungen unter Verwendung von radiomarkiertem Aspartat oder Arginin zeigten, dass durch die Mutationen im N-terminalen Bereich der Synthetase, d.h. bei K261G, E298A und N392D, ein Aspartateinbau nicht mehr stattfand. Die Mutation im C-terminalen Bereich (K497A) bewirkte das Gegenteil, das Enzym K497A baut nur noch Aspartat ein (Tab. 12).

Tabelle 12: Aktivitätstest der punktmutierten Synthetasen

	Wildtyp		K261G		E298A		N392D		K497A	
	Zählimpulse in cpm	n in nmol	Zählimpulse in cpm	n in nmol	Zählimpulse in cpm	n in nmol	Zählimpulse in cpm	n in nmol	Zählimpulse in cpm	n in nmol
[³ H]-Arg	41185	0,08	22085	0,04	21021	0,04	30233	0,06	636	0
[³ H]-Asp	16107	0,04	389	0	839	0	697	0	21543	0,05

n: eingebaute Menge Aminosäure, 2 µg Synthetase pro Ansatz, jeweils Werte aus Kontrollexperimenten (ohne ATP) abgezogen.

Die Mengen eingebaute Aminosäuren variierten zwischen den Enzymen. Ursache dafür können unterschiedliche Cyanophycinqualitäten und -mengen des bei pH 8,2 ungelöst und unhomogen suspendiert im Ansatz vorliegenden Polymers oder durch die Mutationen verursachte Wirkungen auf mehr als eine der Teilreaktionen sein (siehe Diskussion Abschnitt 4.1.). Die qualitativen Ergebnisse waren jedoch eindeutig und reproduzierbar.

In diesen Experimenten wurde nur eine der konstituierenden Aminosäuren angeboten. Mit Wildtyp-Synthetase wurde sowohl mit [³H]-Arginin allein als auch mit [³H]-Aspartat allein ein Einbau gemessen (Tab. 12). Dies bedeutet, dass offenbar bei dem aus *E. coli* isolierten Polymer beide Cyanophycinformen, d.h. eine mit der „stumpfen“ und eine mit der „spitzen“ Form, vorkommen (d.h. sowohl als Struktur analog (DR)₃, d.h. als mit Arginin abgesättigtes Cyanophycin, wie auch analog der Struktur (DR)₃-D, das heißt als mit Aspartat abgesättigtes Cyanophycin, dargestellt in Abb. 5). Ferner wurde zumindest für diese Cyanophycin-Synthetase (aus *A. variabilis*, heterolog in *E. coli* exprimiert) hiermit gezeigt, dass der Einbau einer Aminosäure mechanistisch nicht an die Anwesenheit der anderen konstituierenden

Aminosäure gekoppelt ist, was auch mittels massenspektroskopischer Messungen gezeigt werden konnte (Spektren 2 und 8, Abschnitt 6.2.).

3.8. Komplementierungsversuche mit verschiedenen mutierten Synthetasen

In weiteren Ansätzen wurde untersucht, ob sich verschieden mutierte Synthetasen in ihrer Funktion komplementieren können.

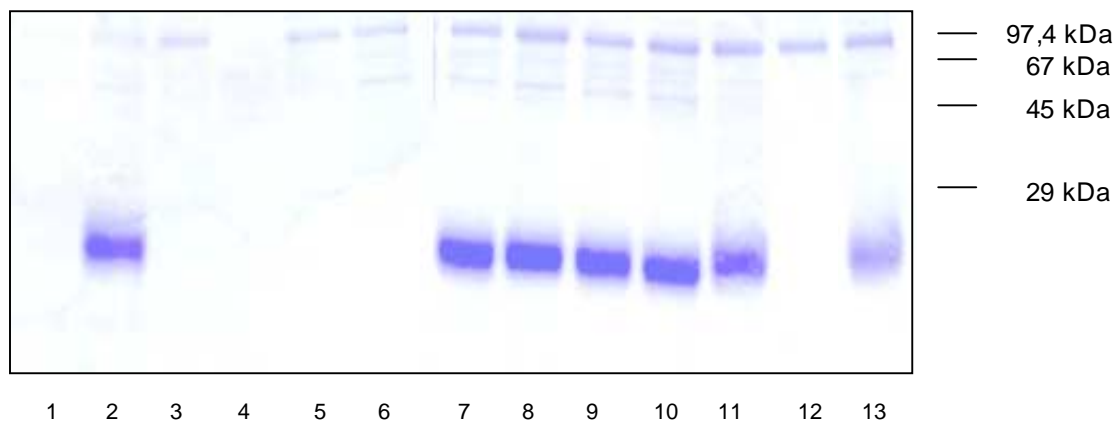


Abbildung 14: *In vitro*-Cyanophycin-Synthese mit Kombinationen verschieden mutierter Synthetasen, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Spur 1: Wt ohne Primer
Spur 2: Wt mit Primer
Spur 3: K261G
Spur 4: E298A
Spur 5: N392D

Spur 6: K497A
Spur 7: K261G, K497A
Spur 8: E298A, K497A
Spur 9: N392D, K497A

Spur 10: K261G, E298A
N392D, K497A
Spur 11: K261G, E298A
Spur 12: K261G, N392D
Spur 13: E298A, N392D

SDS-PAGE mit Reaktionsansätzen einer *in vitro*-Elongationsreaktion, 2,5 µg Synthetase pro Ansatz (Proteinbande bei ca. 100 kDa), Inkubation über Nacht. Wt: Wildtyp-Synthetase.

Bei Inkubation verschiedener Kombinationen mutierter Enzyme für eine Nacht mit Primer und vollständigem Reaktionsansatz, wurde mit einer Ausnahme (Spur 12) Cyanophycin gebildet.

Interessant ist hier, dass die Enzymkombinationen in Spur 11 und 13 eine Cyanophycinbildung zeigen, obwohl alle drei in diesen Ansätzen verwendeten Enzyme K261G, E298A und N392D nach dem Sequenzvergleich aus Abbildung 13 eine Mutation innerhalb des N-terminalen Bereichs aufweisen und Aspartat nicht einbauen konnten (Tab. 12). Beiden Experimenten war gemeinsam, dass das mutierte Enzym E298A eingesetzt wurde. Die Enzymkombination K261G und N392D

zeigte dagegen keine Polymerbildung. Mögliche Erklärungen werden in Abschnitt 4.2. diskutiert.

3.8.1. Deletionsmutanten und separat exprimierte Bereiche

Zusätzlich zu den ortsgerichtet mutierten Synthetasen wurden die C- und N-Bereiche der Synthetase, die möglicherweise eine von dem jeweils anderen Bereich unabhängige Reaktion katalysieren (Abschnitt 3.7.), einzeln exprimiert (siehe Methoden 2.2.6.8.3.). Vom N-Bereich wurden die Aminosäuren 1 bis 447, vom C-Bereich die Aminosäuren 429-901 exprimiert. Weiterhin wurden Deletionsmutanten erzeugt (Abschnitte 2.2.6.8.4. und 2.2.6.8.5.). Im N-Bereich wurden die Aminosäuren 233 bis 307 entfernt (ΔN), im C-Bereich wurden die Aminosäuren 482 bis 758 deletiert (ΔC). Keines der Konstrukte bildete *in vivo* Cyanophycin oder zeigte mit einer der verwendeten Methoden irgendeine Produktbildung oder Aktivität (Ergebnisse nicht gezeigt). Bei Inkubation von verkürzten Synthetasen mit jeweils in dem anderen Bereich verkürzten Synthetasen fand keine Komplementation einer möglicherweise verbliebenen katalytischen Funktion statt (Abb. 15).

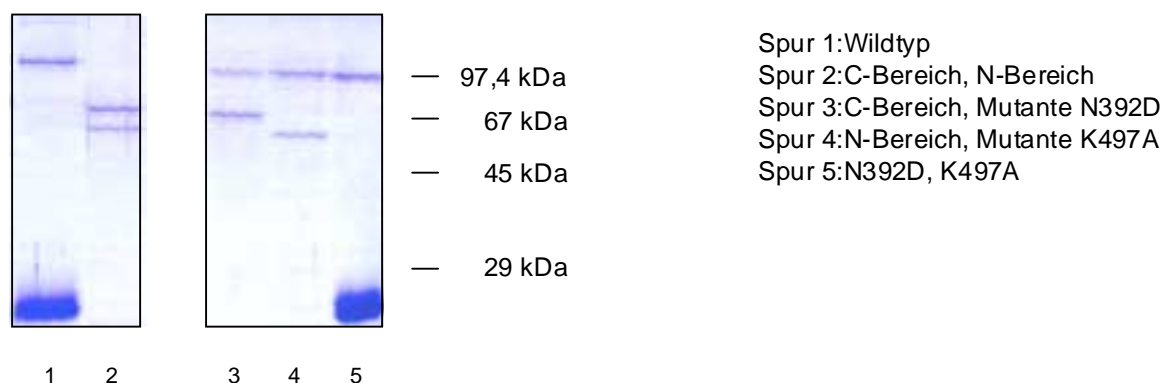


Abbildung 15: *In vivo*-Elongationsansätze unter Verwendung separat exprimierter Bereiche, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

SDS-PAGE: 4 μ g Protein pro Ansatz eingesetzt; Wildtyp, N392D, K497A: Proteinbande bei ca. 100 kDa; C-Bereich: 57 kDa; N-Bereich: 50 kDa)

Offenbar haben alle vier genannten Konstrukte ihre katalytische Aktivität verloren. Ursache könnte eine denaturierte Tertiärstruktur aufgrund fehlerhafter Faltung sein oder eine Abhängigkeit beider Reaktionen von Aminosäureresten, die in beiden Bereichen der Synthetase lokalisiert sind.

3.9. Mechanismus der Cyanophycin-Synthese

Die Cyanophycin-Synthese ist ATP-abhängig. Prinzipiell sind zwei Mechanismen der ATP-abhängigen nichtribosomalen Peptidsynthese bekannt (Abschnitt 1.6.). Sequenzvergleiche zwischen sowohl dem N-terminalen als auch dem C-terminalen Bereich der Cyanophycin-Synthetase und anderen Proteinen zeigen eine Ähnlichkeit zu Ligasen zweier Superfamilien (Abb. 13 und Tab. 10), die alle ein Substrat an der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure phosphorylieren. Keine Ähnlichkeit besteht zu Enzymen, die das Substrat intermediär adenylieren. Weiterhin ist bekannt, dass während der Cyanophycin-Synthese ATP zu P_i und ADP hydrolysiert wird und nicht, wie im Falle der Adenylierungsreaktion, AMP entsteht (Ziegler *et al.* 1998).

Mit Hilfe von Ansätzen, die γ - $[^{32}P]$ -ATP enthielten, wurde versucht, Cyanophycin zu phosphorylieren und Hinweise auf die Art der Phosphatbindung zu erhalten.

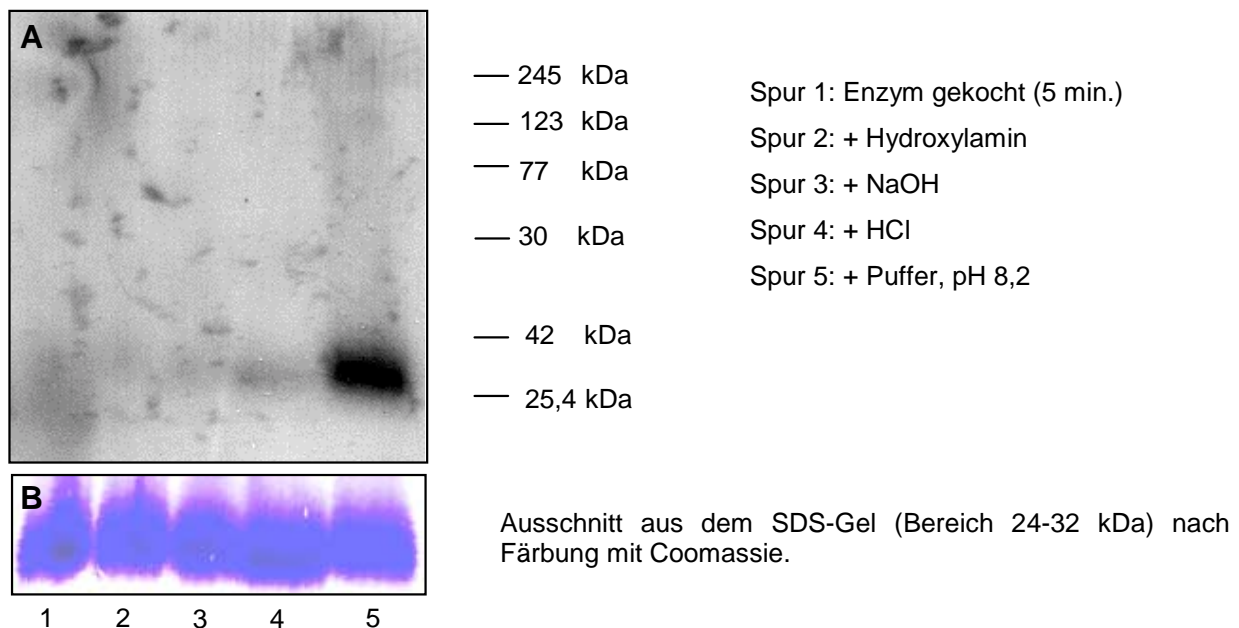


Abbildung 16: Existenz und Stabilität des phosphorylierten Cyanophycins,
SDS-PAGE (15% Acrylamid)

Abb. 16A: Autoradiographie, Abb. 16B: Coomassie Färbung des Gels

Pro Ansatz wurden 0,5 μ g Synthetase eingesetzt. Versuche wurden wie in 2.2.5.4.2. beschrieben durchgeführt.

Die chemische Stabilität von Acylphosphaten ist nur bei relativ neutralen und schwach sauren pH-Werten gegeben (Duclos *et al.* 1991, siehe Tab. 13).

Tabelle 13 (nach Duclos *et al.* 1991): Chemische Stabilität verschiedener phosphorylierter Aminosäuren

Art der Phospho- aminosäure	Stabilität in:			
	Säure	Base	Hydroxylamin	Pyridin
O-Phosphat				
Phosphoserin	+	-	+	+
Phosphothreonin	+	±	+	+
Phosphotyrosin	+	+	+	+
N-Phosphat				
Phosphoarginin	-	-	-	-
Phosphohistidin	-	+	-	-
Phospholysin	-	+	-	-
Acylphosphat				
Phosphoaspartat	-	-	-	-
Phosphoglutamat	-	-	-	-
S-Phosphat				
Phosphocystein	+	+	+	+

Die festgestellte Instabilität des Phosphates gegenüber Säuren und Basen (Abb. 16A, Spuren 3 und 4) lässt nach dem Schema aus Tabelle 13 die Existenz eines Phosphoarginins oder eines Acylphosphates vermuten. Da eine Reaktion der Guanidinogruppe des Argininrestes ausgeschlossen werden kann (siehe Struktur von Cyanophycin, Abb. 2, Abschnitt 1.1.) bleibt als einzige plausible Deutung des Befundes aus Abb. 16A, Spur 5, dass die Radioaktivität des phosphorylierten Cyanophycins auf ein α -[^{32}P]- und/oder β -[^{32}P]-Acylphosphat des Aspartatrestes zurückzuführen ist. Da sich die Kettenverlängerung vom C-Terminus aus vollzieht, sind die α - und β -Carboxylgruppen des C-terminalen Aspartatrestes neben der α -Aminogruppe der eintretenden Aminosäure die einzigen für die Elongation des Cyanophycinmolekül mit der Struktur aus Abbildung 2 in Frage kommenden funktionalen Gruppen. Die Erfüllung der genannten Stabilitätskriterien des Acylphosphats bestätigen somit auch die mechanistische Verwandtschaft zu Enzymen der Mur-Superfamilie und der ATP-grasp-Superfamilie, bei denen eine Phosphorylierung des Substrates als Acylphosphat bekannt war.

Auch für die Enzyme K261G, E298A und N392D konnte die Existenz von Phospho-Cyanophycin gezeigt werden (Abb. 17). In Anwesenheit der Aminosäuresubstrate war kein Phospho-Cyanophycin mehr zu detektieren (Abb. 17, jeweils Spuren „+AS“). Interessant ist, dass bei Inkubation mit der Mutante K497A auch ohne Aminosäuresubstrate im Ansatz keine Bildung von Phospho-Cyanophycin gefunden wurde (Abb. 17, Spur „ohne Aminosäuresubstrate“), obwohl diese die Fähigkeit besitzt, Aspartat an das Cyanophycinmolekül zu knüpfen (Tab. 12).

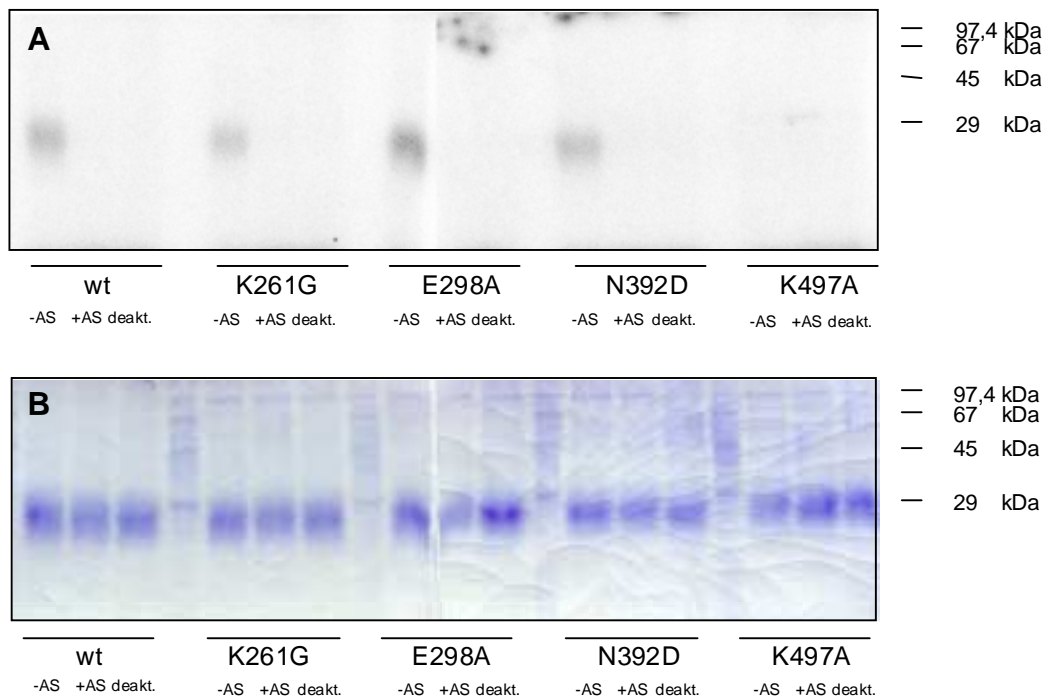


Abbildung 17: Phosphorylierungsexperimente, SDS-PAGE (15% Acrylamid)

A: Autoradiographie; B: Acrylamidgel, mit Coomassie gefärbt

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Cyanophycin unter Verwendung von Wildtyp-Synthetase und den mutierten Synthetasen. A zeigt eine Autoradiographie, B zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel. Jeweils 0,5 µg Synthetase eingesetzt (Proteinbande bei ca. 100 kDa).

- AS: Inkubation ohne Aminosäuresubstrate

+AS: Inkubation mit Aminosäuresubstraten

deakt.: Enzym deaktiviert (100°C, 5 min)

Im Folgenden werden denkbare Gründe für das unterschiedliche Verhalten der Mutante K497A, bzw. die in diesem Falle fehlende Phosphorylierung des „stumpfen“, d.h. mit Arginin abgesättigten Cyanophycins unter Synthese- und Elektrophoresebedingungen andiskutiert und anschließend daraus abgeleitete Untersuchungen dokumentiert.

3.9.1. Hypothese 1: Die α -Carboxylgruppe der Cyanophycin-Präparation liegt immer phosphoryliert vor

Um eine denkbare bereits in der Cyanophycinpräparation vorliegende Phosphorylierung auszuschließen, wurde das Cyanophycin zusätzlich zu der regulären Extraktion mit 0,1 M HCl jeweils alkalisch behandelt (40°C, 2,5 h, pH 10). Ausgehend von der Information über die Instabilität von Acylphosphaten (Duclos *et al.* 1991) bei hohen wie niedrigen pH-Werten (Tab. 13) wurde angenommen, dass so dieses mögliche Problem beseitigt werden könnte.

Es konnte mit keinem der Proteine eine stärkere Phosphorylierung erreicht werden (Ergebnisse nicht gezeigt), die Aktivität als Substrat für den Einbau der Aminosäuren Aspartat bzw. Arginin blieb aber erhalten (Abb. 18).

3.9.2. Hypothese 2: Der Anteil des „stumpfen“ Cyanophycins, d.h. des Cyanophycins ohne überhängenden Aspartatrest, ist relativ gering

Um die Frage des Anteils „spitzer“ oder „stumpfer“ Cyanophycinqualitäten zu untersuchen, wurde mit nur einer der konstituierenden Aminosäuren bzw. in einem Kontrollexperiment ohne Aminosäuren vorinkubiert. (Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur und Synthesebedingungen, siehe 2.2.5.2., im Thermomixer geschüttelt).

Das mit Aspartat vorbehandelte „spitze“ Cyanophycin zeigt mit beiden separat angebotenen [³H]-markierten Aminosäuren erhöhte Einbauraten. Die Eigenschaften dieses Materials haben sich offenbar während der Inkubation mit Aspartat oder der anschließenden Prozedur (mehrfache Säureextraktion und alkalische Behandlung, siehe 2.2.5.4.1.) verändert. Eine Vorinkubation mit Arginin bewirkte hauptsächlich eine relativ höhere Einbaurate für [³H]-Aspartat (Abb. 18).

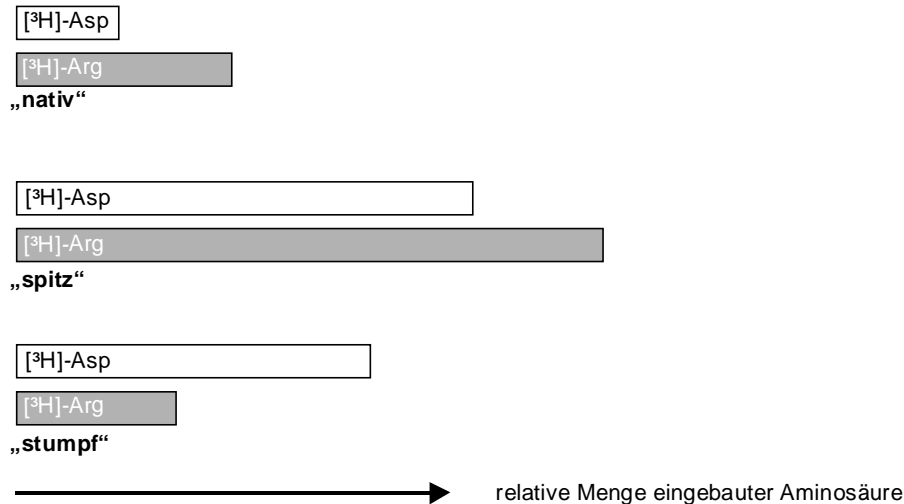


Abbildung 18: Relative Menge eingebauter Aminosäuren nach Vorbehandlung des Cyanophycins unter verschiedenen Bedingungen

„nativ“: Cyanophycin wurde ohne Aminosäuren vorinkubiert

„spitz“: Cyanophycin wurde mit Aspartat vorinkubiert

„stumpf“: Cyanophycin wurde mit Arginin vorinkubiert

Die Konzentrationen des Cyanophycins in den jeweiligen Ansätzen waren nach Vorinkubation möglicherweise geringer als 0,87 mg/ml (vgl. Abschnitt 2.2.5.1.). Zwar wurden definierte Mengen Cyanophycin eingesetzt, doch es ist unklar, wieviel davon nach der Vorbehandlung extrahiert werden konnte. Vereinfachend wurde eine vollständige Ausbeute eingesetzten Cyanophycins angenommen.

Das vorbehandelte und dadurch offenbar veränderte Cyanophycin wurde für weitere Phosphorylierungsexperimente verwendet. Sowohl „natives“ als auch „spitzes“ Cyanophycin kann phosphoryliert werden (Abb. 19, Spur 2, Spur 12). Die Anwesenheit von 0,2 mM Arginin im Ansatz bewirkte, dass kein Phospho-Cyanophycin mehr detektiert wurde (Abb. 19, Spur 4, Spur 14). Eine Phosphorylierung des „stumpfen“ Cyanophycins war nicht nachweisbar.

Die Phosphorylierung von „nativem“ Cyanophycin ist bei Anwesenheit von 4 mM Aspartat weit geringer (Spur 3). Auf „spitzes“ Cyanophycin hat Aspartat keine starke die Phosphorylierung beeinflussende Wirkung (Spur 13).

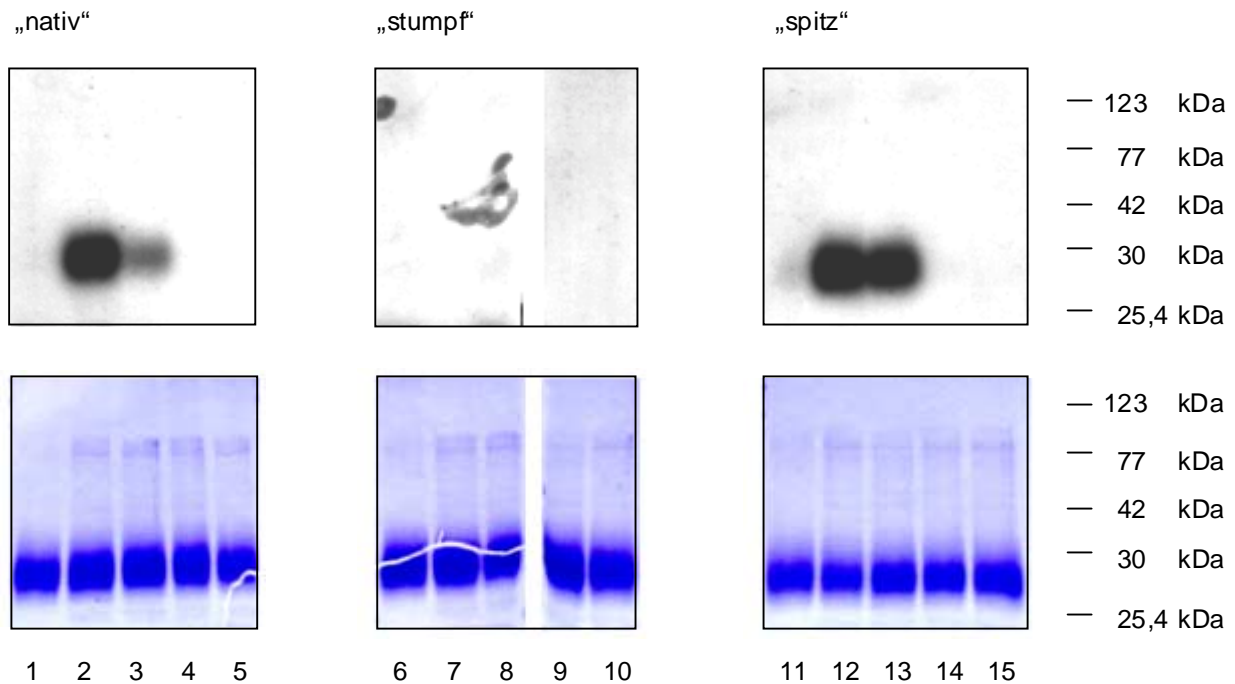


Abbildung 19: Phosphorylierung vorbehandelten Cyanophycins. SDS-PAGE
(15% Acrylamid)

Phosphorylierungsversuche unter Verwendung von mit Aminosäuresubstraten vorbehandelten Cyanophycins. Obere Abbildungen zeigen Autoradiographien nach SDS-PAGE, untere zeigen die gleichen Gele nach Färbung mit Coomassie, [ATP] = 1 μ M. Es wurde jeweils 0,5 μ g Synthetase pro Ansatz eingesetzt.

Spur 1, 6, 11: ohne Enzym
Spur 2, 7, 12: ohne Aminosäuren
Spur 3, 8, 13: + Asp
Spur 4, 9, 14: + Arg
Spur 5, 10, 15: + Asp, + Arg

Der Befund, dass bei Inkubation mit Wildtyp-Cyanophycin-Synthetase kein „stumpfes“ Phospho-Cyanophycin nachgewiesen werden konnte, sowie das Ergebnis, dass das Enzym K497A, das „stumpfes“ Cyanophycin als Substrat benötigt, keine Bildung von Phospho-Cyanophycin zeigte, lässt mich vermuten, dass sämtliche Schwärzungen der gezeigten Autoradiographien ausschließlich auf eine radioaktive Phosphorylierung der β -Carboxylgruppe zurückzuführen sind.

3.9.3. Hypothese 3: Cyanophycin-Synthetase katalysiert eine schnelle Dephosphorylierung des α -Acylphosphates

Um das Problem einer denkbaren schnellen Rückreaktion zu reduzieren, wurde der Versuch der Phosphorylierung durch das mutierte Protein K497A in Anwesenheit von

Creatinphosphokinase (10 units^{*}) und einem Überschuss an Phosphocreatin (c=100 mM) wiederholt. Auf diesem Wege sollte entstehendes ADP schnell aus dem Ansatz entfernt werden.

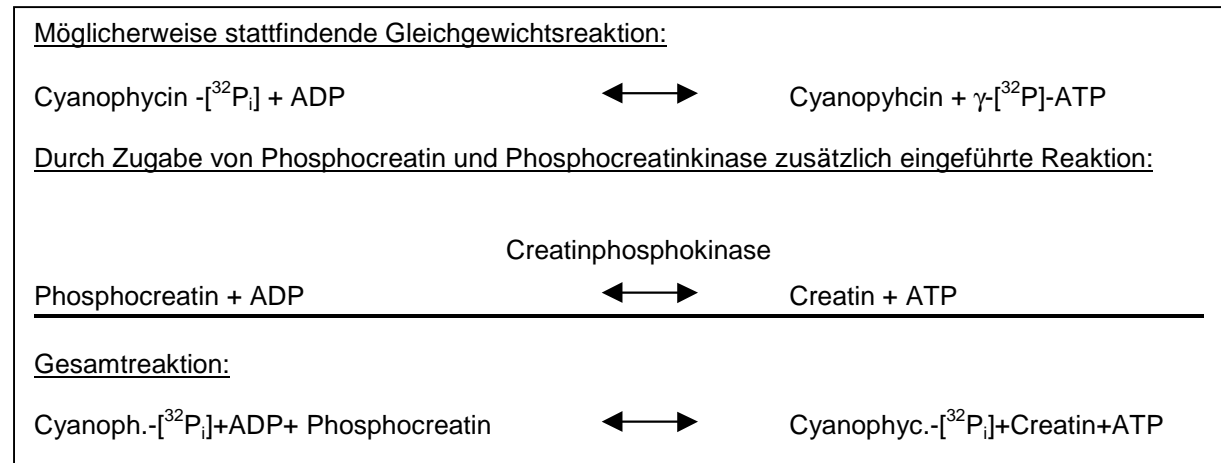


Abbildung 20: Zusätzlich eingeführte Reaktion zur Beseitigung von entstehendem ADP

Die Zugabe einer großen Menge Phosphocreatin und Kinase hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der Cyanophycin-Synthetase ([³H]-Arg bzw. [³H]-Arg+Asp Messungen, Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Veränderung der Phosphorylierungseigenschaften alkalibehandelten Cyanophycins wurde aber nicht festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Falsifizierung dieser Hypothese kann aber mit Hilfe dieses Versuches nicht erreicht werden, weil es möglich ist, dass ADP auch nach der Bildung des α-Acylphosphates vom Enzym gebunden bleibt und somit nicht für die Kinase zugänglich ist.

3.9.4. **Hypothese 4: Die Phosphorylierung der α-Carboxylgruppe ist mechanistisch an die Bindung eines Aspartatrestes gekoppelt.**

Diese meiner Meinung nach einzige plausible Interpretation der Ergebnisse wird in Abschnitt 4.1.2.2. diskutiert. Kinetische Untersuchungen, die diese These stützen oder falsifizieren könnten, wurden nicht durchgeführt. Vergleichende Röntgen-Kristallstrukturuntersuchungen von Kristallen der Cyanophycin-Synthase ohne und

^{*}Ein unit steht für eine Menge Phosphocreatinkinase, die 1,0 µmol Phosphat von Phosphocreatin auf ADP überträgt (eine Minute Reaktionszeit; pH 7,4; 30°C.

mit gebundenen Substraten sind nicht möglich - es gibt bis heute keine geeigneten Kristalle einer Cyanophycin-Synthetase.

4. Diskussion

4.1. Reaktionsmechanismus der Cyanophycin-Synthetase

Durch den Einsatz synthetischer N- bzw. C-terminal blockierter Primer konnte mittels MALDI-Massenspektroskopie, SDS-PAGE und Gelfiltration gezeigt werden, dass sich die Elongation von Cyanophycin vom C-Terminus aus vollzieht. Ferner wurde festgestellt, dass die Aminosäuren Aspartat und Arginin einzeln und sukzessiv von der Cyanophycin-Synthetase mit synthetischen Primern oder Cyanophycin verknüpft werden. Der Mechanismus für die Ausbildung der Peptidbindung bzw. der Isopeptidbindung beinhaltet vermutlich jeweils eine Phosphorylierung der Carboxylgruppen des C-terminalen Aspartatrestes des Cyanophycin-Primers. Dabei ist die Bildung der Peptidbindung vom N-Bereich, die der Isopeptidbindung vom C-Bereich der Synthetase abhängig.

Die Reaktionen, die zur Verlängerung eines Cyanophycin-Moleküls um zwei Aminosäuren, also um ein β -Aspartyl-Arginin-Strukturelement führen, können in Phosphorylierungsschritte und Elongationsschritte eingeteilt werden. Die Reihenfolge dieser Schritte sowie eine möglicherweise feste Abfolge der verschiedenen Enzym-Substrat-Bindungen und möglicher Änderungen der Konformation der Cyanophycin-Synthetase in Abhängigkeit der Substrate bleibt ungeklärt. Vorstellungen dazu werden aber im weiteren Verlauf dieses Abschnittes diskutiert. Die Bildung des β -Acylphosphates konnte über Autoradiographie gezeigt werden, die des entsprechenden α -Acylphosphates jedoch nicht.

Abbildung 21 zeigt eine Modellvorstellung für einen Elongationszyklus, bei dem jeweils eine Aktivierung als Acylphosphat und eine Kondensation (Verknüpfung der Aminosäuren durch nucleophile Substitution) des zu addierenden Substrats alternieren:

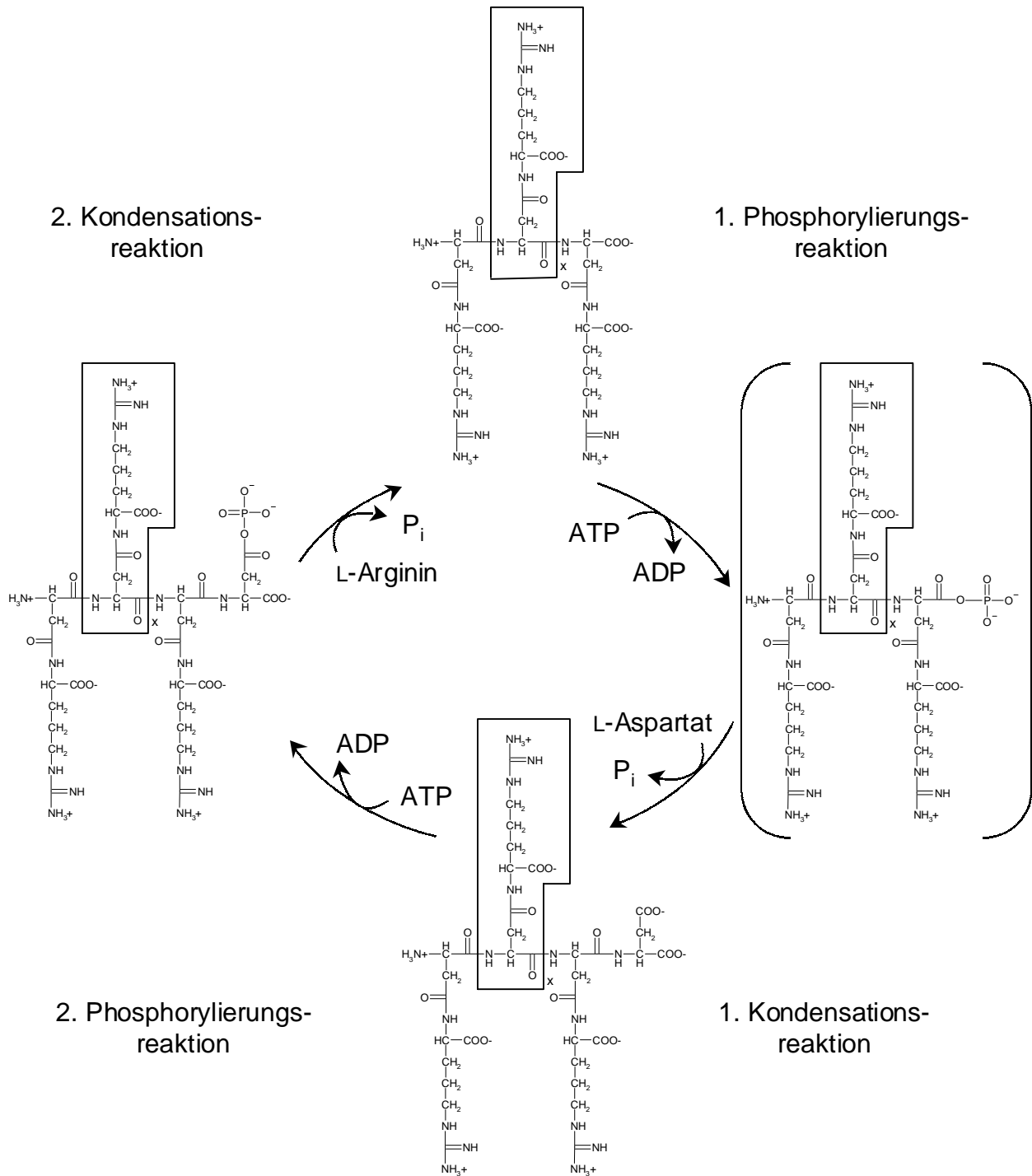


Abbildung 21: Elongationsmechanismus: alternierende Abfolge von
Phosphorylierung und Kondensationsreaktion

Das nicht nachgewiesene „stumpfe“ α -Phospho-Cyanophycin (rechte Formel in Abb. 21) ist in Klammern gezeigt. Das β -Asp-Arg-Strukturelement mit der Anzahl x ist umrahmt gezeigt. Jeweils innerhalb eines vollständigen Elongationszyklus erhöht sich die Größe x auf x+1, in dieser Grafik nach Abschluss der 2. Kondensationsreaktion.

Es muss angenommen werden, dass das nicht nachgewiesene α -Acylphosphat intermediär existiert, da die Struktur von Cyanophycin eine gesicherte Erkenntnis ist (Simon & Weathers 1976, Steinbüchel *et al.* 1997, Hejazi *et al.* 2002) und während der Gesamtreaktion ATP zu ADP und P_i hydrolysiert wird (Ziegler *et al.* 1998).

4.1.1. Aktivität des C-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase

Für die Planung von ortsgerichteten Mutagenesen wurden durch Sequenzvergleiche Aminosäuren mit möglicher Nucleotid-Bindungs-Funktion ermittelt (Tab. 10, Abschnitt 3.7.). Es wurden ortsgerichtete Mutagenesen an vier in allen Cyanophycin-Synthetasen konservierten Positionen durchgeführt (Sequenzvergleiche in Abschnitt 6.3.1.). Die im N-Bereich durchgeführten Mutationen K261G, E298A und N392D bewirkten, dass ein Einbau von $[^3H]$ -Asp nicht mehr stattfand, Arginin jedoch eingebaut werden konnte (Tab. 12, Abschnitt 3.7.).

Die in Abbildung 21 (Abschnitt 4.1.) dargestellte "2. Phosphorylierungsreaktion" von Cyanophycin konnte mit dem Wildtyp-Enzym, den Varianten K261G, E298A und N392D, sowie mit „nativem“ und „spitzem“ Cyanophycin nachgewiesen werden (Abb. 17 und 19, Abschnitt 3.9.). Die Anwesenheit von 0,2 mM Arginin in einem Reaktionsansatz mit Wildtyp-Enzym bewirkte, dass keine Phosphorylierung mehr zu detektieren war (Abb. 19, Spuren 4 und 14). Zusammen mit dem Befund, dass ein $[^3H]$ -Arg-Einbau durch das Wildtyp-Enzym oder die Varianten K261G, E298A oder N392D weiterhin katalysiert wurde, ergibt sich die Vermutung, dass die Anwesenheit von Arginin im Reaktionsansatz eine Dephosphorylierung des β -Acylphosphates bei gleichzeitiger Verknüpfung des Cyanophycin-Primers mit Arginin bewirkte (siehe "2. Kondensationsreaktion", Abb. 21).

4.1.1.1. Reihenfolge der Substratbindung durch den C-Bereich

Die strukturelle Ähnlichkeit des C-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase zu einer Superfamilie von Ligasen, der mehrere Murein bildende Ligasen angehören (siehe Abschnitt 3.7.), lässt Spekulationen über die Reihenfolge der Substratbindung zu.

Der Lysinrest K497 als Teil des hoch konservierten P-loops (Sequenzvergleiche in Abschnitt 6.3.) hat möglicherweise die Funktion der Fixierung des β -Phosphats des Substrats ATP im aktiven Zentrum zur Arginin-Bindung (Tab. 10, Abschnitt 3.7.). Analog zu der von mir erzeugten Mutation K497A von CphA aus *A. variabilis* existiert eine Studie, in der die Mutante K130A von MurC (UDP-MurNAc:L-

Alanin Ligase) aus *E. coli* untersucht wurde (Bouhss *et al.* 1997). Diese MurC-Mutante weist eine auf 1/1000 verringerte Aktivität und einen stark erhöhten K_M -Wert für ATP und das Substrat UDP-MurNAc (UMA) auf. Es wurde vorgeschlagen, dass die UMA-Bindung ATP-abhängig ist und dass die Substratbindung durch MurC in der Reihenfolge ATP, UMA und zuletzt Alanin erfolgt (Bouhss *et al.* 1997). Eine Untersuchung der analogen Mutante in MurD ergab das gleiche Ergebnis (Bouhss *et al.* 1999, Bertrand *et al.* 2000). Eine entsprechende Reihenfolge der Substratbindung wurde für MurF aus *E. coli* aufgrund kinetischer Daten von Anderson *et al.* (1996) vorgeschlagen.

Übertragen auf den C-terminalen Bereich der Cyanophycin-Synthetase lässt sich deshalb folgende Reihenfolge der Substratbindung vermuten: Zuerst würde ATP, anschließend der „spitze“ Cyanophycinprimer und zuletzt Arginin gebunden. Das β -Acylphosphat würde ausgebildet und Arginin mit dem Primer kondensiert werden.

4.1.1.2. Aspartat verringert eine nachweisbare Phosphorylierung

Abbildung 19 zeigt, dass Aspartat eine deutliche Abschwächung der Phosphorylierung des „nativen“ Cyanophycins (Abb. 19, Spur 3) und eine geringe Verringerung für das „spitze“ Cyanophycin bewirkte (Abb. 19, Spur 13). Da „stumpfes“, d.h. α -Phospho-Cyanophycin nicht gefunden wurde (Abb. 19, Spur 8) trat also vermutlich eine Hydrolyse des β -Acylphosphates ohne Ausbildung einer Amidbindung ein, denn das β -Acylphosphat, das detektiert werden konnte, reagiert nach Abbildung 21 nicht mit Aspartat, sondern nur mit basischen Aminosäuren. Diese Reaktion führt also möglicherweise zu einem Verlust an ATP.

Möglich ist, dass durch die Aspartatbindung des Wildtyp-Enzyms eine Konformationsänderung ausgelöst wurde, die entweder die „2. Phosphorylierungsreaktion“ (Abb. 21) blockierte oder eine sofortige Hydrolyse des β -Acylphosphates auslöste. Eine mögliche Dephosphorylierung des β -Acylphosphates könnte durch eine geringe Substratspezifität für das „spitze“ Cyanophycin verursacht worden sein, denn beide Acylphosphate haben, vom C_α -Atom des C-terminalen Aspartatrestes gerechnet, lediglich eine um eine CH_2 -Gruppe unterschiedliche Entfernung zum Phosphorylierungs-Ort innerhalb des C-terminalen Bereiches der Cyanophycin-Synthetase. Im Vergleich zu allen anderen

beteiligten Substraten, insbesondere Cyanophycin, ist dies eine geringe molekulare Differenz.

4.1.2. Aktivität des N-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase

Der N-Bereich der Cyanophycin-Synthetase ist maßgeblich an der Katalyse der Peptidbindung, d.h. der Verknüpfung von Cyanophycin mit Aspartat beteiligt, da das Enzym K497A, bei dem eine Mutagenese im C-Bereich durchgeführt wurde, die Fähigkeit besitzt, [³H]-Aspartat in das Polymer zu inkorporieren, [³H]-Arginin aber nicht mehr mit Cyanophycin verknüpfen kann (Tab. 12).

Vermutlich ist der Reaktionsmechanismus für den N-Bereich der gleiche wie der für den C-Bereich: Die α -Carboxylgruppe des „stumpfen“ Cyanophycins wird als Acylphosphat aktiviert, ein nucleophiler Angriff der α -Aminogruppe eines Aspartatmoleküls führt zur Bildung der Peptidbindung. Das postulierte, während dieser Reaktion intermediär entstehende Zwischenprodukt (das „stumpfe“ Phospho-Cyanophycin), konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (Abb. 19, Spur 7).

Gestützt wird die Annahme, dass α -Acylphosphat während der Reaktion mit Aspartat entsteht, durch die Sequenzvergleiche, die eine Homologie mit den relativ gut charakterisierten Enzymen der ATP-grasp-Superfamilie nahelegen (Berg *et al.* 2000).

Die einzige Alternative zur intermediären Existenz eines Acylphosphates wäre eine Phosphorylierung der anderen beteiligten funktionellen Gruppe, der α -Aminogruppe von Aspartat. N-Phosphorylierungen von α -Aminogruppen sind meines Wissens in der Literatur nicht beschrieben. In Abschnitt 3.9. wurden vier Hypothesen zur Erklärung des Befundes eingeführt, dass "stumpfes" Phospho-Cyanophycin sowie eine Phosphorylierungsreaktion durch die Enzymmodifikation K497A nicht nachgewiesen werden konnte. Sowohl für die „Hypothese 1“, dass die Cyanophycin-Präparationen bereits als α -Acylphosphat vorlagen (Abschnitt 3.9.1.) als auch für die „Hypothese 3“ (Abschnitt 3.9.3.) einer schnellen Rückreaktion des postulierten α -Acylphosphates in Gegenwart von ADP, konnten experimentell keine Anhaltspunkte gefunden werden. Die verbliebenen zwei Hypothesen werden im Folgenden erörtert.

4.1.2.1. **Möglicherweise ist der Anteil „stumpfen“ Cyanophycins gering**

Das mutierte Enzym K497A kann nur die Aminosäure Aspartat einbauen (Tab. 12), es benötigt als Substrat ein mit Arginin gesättigtes, d.h. „stumpfes“ Cyanophycinmolekül, da nach meinen Ergebnissen keine Verlängerung eines „spitzen“ Cyanophycinmoleküls mit Aspartat stattfindet (Massenspektren 6 und 7, Abschnitt 6.2.1.). Die von K497A katalysierte Reaktion zwischen „stumpfen“ Cyanophycin und Aspartat verläuft vermutlich über eine intermediäre Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe des Cyanophycins, wie in Abbildung 21 dargestellt ist. Ein geringerer Anteil „stumpfen“ Cyanophycins (Hypothese 2, Abschnitt 3.9.2.) könnte zu einer geringen Menge an α -Acylphosphat führen. Da die gezeigten Autoradiographien keine Information über Mengen gebildeten Phospho-Cyanophycins liefert, könnte ein Detektionsproblem vorliegen, d.h. die Menge gebildeten „stumpfen“ Phospho-Cyanophycins wäre nicht nachweisbar.

Abbildung 18 zeigt, dass die Mengen eingebauten $[^3\text{H}]$ -Arginins bei mit Aspartat vorinkubiertem „spitzen“ Cyanophycin ebenso wie bei dem nicht vorinkubierten „nativen“ Cyanophycin höher sind, als die für $[^3\text{H}]$ -Aspartat. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass „natives“ Cyanophycin aus *E. coli* nach seiner Isolierung überwiegend in der spitzen Form vorkommen könnte oder dass ein höherer Anteil „spitzen“ Cyanophycins durch die Isolierungsmethode, d.h. Lösung in 0,1 N HCl und Ausfällung bei neutralem pH-Wert, verursacht worden sein könnte.

Gesichert ist aber die Erkenntnis, dass beide Cyanophycin-Formen, d.h. „stumpfes“ und „spitzes“ Cyanophycin, Bestandteile der Cyanophycinpräparation sind, da beide Aminosäuren unabhängig voneinander in Cyanophycin inkorporiert werden können (Tab. 12).

Massenspektrum 15 (Abschnitt 6.2.) zeigt demgegenüber ausschließlich „stumpfes“ Cyanophycin. Ursache dafür könnte sein, dass die Verlängerung der Cyanophycin-Primer mit Arginin bei Einsatz beider konstituierender Aminosäuren ungleich schneller als die mit Aspartat abläuft.

4.1.2.2. **Die Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe könnte mechanistisch an die Bindung eines Aspartatrestes gekoppelt sein**

Es ist weiterhin möglich, dass die Phosphorylierung der α -Carboxylgruppe mechanistisch an die Bindung von Aspartat gekoppelt ist.

Die strukturell verwandten Enzyme der ATP-grasp-Superfamilie (Abschnitt 1.9.) weisen meistens eine aus drei Domänen bestehende Struktur auf. Alle Strukturvergleiche von mit und ohne Substrat (bzw. Substrat-Analogen) kristallisierten Proteinen zeigen eine deutliche Bewegung der B-Domäne in Richtung auf die C-Domäne. Die Substrate liegen dazwischen (Thoden *et al.* 2000).

Ein Mitglied der ATP-grasp-Ligase-Superfamilie ist die Biotin-Carboxylase, die ein Teil des Acetyl-CoenzymA-Carboxylase-Komplexes ist, der eine Carboxylgruppe eines Hydrogencarbonat-Ions auf Acetyl-CoenzymA überträgt. Thoden *et al.* (2000) beschreiben die B-Domäne der Biotin-Carboxylase aus *E. coli* als eine Art Deckel, der die gebundenen Substrate in der Bindungstasche fixiert. Blanchard *et al.* (1999) und Sloane *et al.* (2001) untersuchten die Kinetik der Substratbindung durch die Biotin-Carboxylase bzw. mehrerer punktmutierter Varianten und stellten einen substratinduzierten Synergismus fest: ATP kommt erst nach der Bindung von Biotin in eine für die ATP-Hydrolyse bzw. Phosphorylierung des Carbonates passende Position, weil die Biotin-Carboxylase erst nach der Bindung von Biotin eine energetisch günstige Konformation, eine sogenannte „near attack conformation“ (Bruice & Lightstone 1999), einnimmt. Die Reihenfolge der Substratbindung durch die Biotin-Carboxylase ist folgende: Zuerst wird ATP gebunden, was relativ zu den anderen Teilreaktionen die bedeutendste Konformationsänderung des Enzyms auslöst, anschließend wird Bicarbonat und zuletzt Biotin gebunden.

Übertragen auf die Reaktion des N-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase würde das für die Reihenfolge der Substratbindung bedeuten, dass zuerst ATP, anschließend „stumpfes“ Cyanophycin (entspricht Hydrogencarbonat bei der Reaktion der Biotin-Carboxylase) und zuletzt Aspartat (entspricht Biotin) vom N-Bereich gebunden würde. Die Bindung von Aspartat würde sowohl die ATP-Hydrolyse und die Phosphorylierung von „stumpfen“ Cyanophycin aber auch die Verknüpfung von Aspartat mit Phospho-Cyanophycin induzieren. Dies könnte die Ursache für das nie gefundene „stumpfe“ Phospho-Cyanophycin sein (Abb. 19, Spur 7), sowie außerdem für die nicht gefundene Phosphorylierung von Cyanophycin durch die im C-terminalen Bereich mutierte Synthetase K497A (Abb. 17). Bildlich vorstellen lässt sich dieser Zusammenhang als „Deckelwirkung“ einer spekulativen B-Domäne des N-Bereiches der Cyanophycin-Synthetase. Dieser „Deckel“ könnte so lange geschlossen bleiben, bis die Ausbildung der Peptidbindung abgeschlossen ist.

Diese Hypothese könnte überprüft werden durch kinetische Untersuchungen in Verbindung mit der Erzeugung verschiedener Mutanten oder den Einsatz eines Substrats, das wie Aspartat vom Enzym gebunden wird, aber keine α -Aminogruppe besitzt. Im zweiten Fall würde die Peptidbindung nicht ausgebildet, das postulierte Acylphosphat sollte aber bestehen bleiben können. Für kinetische Untersuchungen der Cyanophycinbindung wären allerdings größere Mengen einheitlichen Cyanophycins notwendig, da eine uneinheitliche Primär- und Sekundärstruktur des Cyanophycins immer verschiedene Interpretationen der Ergebnisse zulässt. Cyanophycin aus biologischen Quellen hat dafür keine ausreichende Homogenität.

4.1.2.3. Zusammenfassung der Experimente zur Phosphorylierung von Cyanophycin durch den N-Bereich der Cyanophycin-Synthetase

Der N-Bereich der Cyanophycin-Synthetase katalysiert den Einbau von Aspartat (Abschnitt 3.7.). Es muss angenommen werden, dass die gesamten Schwärzungen der Autoradiographien in den Abbildungen 17 und 19 (Abschnitt 3.9.) von [^{32}P]-markierten β -Acyl-Phosphaten verursacht sind und das α -Acylphosphat nicht detektiert wurde (Abschnitt 4.1.).

Die einzige ohne Widersprüche auskommende Erklärung dafür, dass das α -Phospho-Cyanophycin nicht nachgewiesen werden konnte, ist die Hypothese, dass die Phosphorylierung erst nach Bindung von Aspartat durch die Cyanophycin-Synthetase eintritt, sodass keine ATP-Hydrolyse ohne Kondensation von Aspartat und Cyanophycin geschieht (Abschnitt 4.1.2.2.). Aufgrund der in Abschnitt 4.1.2. dargelegten Vergleiche vermute ich die Bindungsreihenfolge ATP, „stumpfes“ Cyanophycin und zuletzt Aspartat.

4.1.3. Aktivitäten der Bereiche im Vergleich

Sowohl „stumpfes“ als auch „natives“ Cyanophycin sind in der Präparation enthalten, da sowohl [^3H]-Asp als auch [^3H]-Arg ohne Anwesenheit der komplementären Aminosäure mit Cyanophycin verknüpft werden konnten (Tab. 12, Spalte „nativ“). Dass die vermutete Dephosphorylierung bei Anwesenheit von Arginin vollständig ablief, kann damit erklärt werden, dass das α -Acylphosphat in dieser Arbeit nie detektiert werden konnte, also vermutlich ausschließlich β -Phospho-Cyanophycin zu detektieren war.

Die Reihenfolge der Substratbindung durch beide aktive Zentren der Cyanophycin-Synthetase könnte, wie anhand von Vergleichen mit verwandten Enzymen (Abschnitte 4.1.1.1. und 4.1.2.2.) beschrieben, gleich sein: Zuerst würde ATP, anschließend Cyanophycin und zuletzt das Aminosäuresubstrat gebunden. Diese Reihenfolge könnte unkoordiniert oder koordiniert und evtl. in den C- und N-terminalen Bereichen der Synthetase zeitlich verschränkt erfolgen. Im Verlauf der Phosphorylierungsreaktionen unterscheiden sich die Aktivitäten beider Bereiche aber offenbar. Eine abschließende Klärung der Wechselwirkungen zwischen Substraten und Cyanophycin-Synthetase kann nur durch kinetische Untersuchungen oder durch Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der Cyanophycin-Synthetase erfolgen.

4.2. Komplementierungsversuche

Sämtliche Kombinationen von jeweils in N- oder C-Bereich mutierten Synthetasen komplementierten sich, sie bildeten bei vollständigem *in vitro*-Reaktionsansatz über Nacht färbbare Mengen Polymer (Abschnitt 3.8., Abb. 14). Es ergab sich der auffällige Befund, dass die Funktion von E298A nicht nur mit dem im C-Bereich mutierten Enzym K497A komplementiert werden kann, sondern auch mit beiden anderen ebenfalls im N-Bereich veränderten Mutanten K261G und N392D. Wie Tabelle 10 zeigt, ist E298A möglicherweise als einzige der im N-Bereich mutierten Aminosäuren nicht an der Phosphatgruppenbindung des ATP beteiligt. Räumlich etwas entfernt könnte E298 die Funktion haben, den Adeninrest zu koordinieren.

Die Katalyse von Amidbindungen durch die Cyanophycin-Synthetase besteht aus zwei Teilreaktionen: Zuerst wird ein Acylphosphat gebildet, anschließend folgt eine Kondensation mit einer der Aminosäuren (dargestellt in Abb. 21). Es ergeben sich zwei Spekulationen, wie die beobachtete Ergänzung von Teilfunktionen im N-Bereich der Synthetase zustande kommen kann:

- Die α -Carboxylgruppe wird als Acylphosphat aktiviert, dieses α -Acylphosphat diffundiert zu einem anders mutierten Synthetasemolekül, das anschließend die Bildung der Peptidbindung katalysieren kann
- Phosphorylierungs- und Elongationsreaktion komplementieren sich in einem Hetero-Di- oder Oligomer der Synthetase

Sämtliche im N-Bereich mutierten Synthetasen konnten „spitzes“ Cyanophycin an der β -Carboxylgruppe des überhängenden Aspartatrestes phosphorylieren (Abb. 17) und anschließend mit Arginin verknüpfen (Tab. 12). Die Enzym-Varianten K261G und N392D haben möglicherweise die gleiche Teilfunktion verloren, denn eine Kombination aus K261G und N392D (Abb. 14, Spur 12) führt im Gegensatz zu den beiden anderen Kombinationen von N-Bereich-Mutanten nicht zur Bildung des Polymers.

Eine Mutante könnte also eventuell das Acylphosphat bilden, anschließend könnte das Phospho-Cyanophycin zu einer anders mutierten Synthetase diffundieren, durch die dann die Bildung der Peptidbindung katalysiert würde. Das β -Acylphosphat besitzt eine gewisse Stabilität bei neutralem pH-Wert, denn es konnte als Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Abb. 16). Es erscheint also möglich, dass diese Stabilität ausreicht, um eine (ungerichtete) Diffusion zu einer anders mutierten Synthetase zu überdauern.

Eine Interpretation ist also, dass eine N-Bereich-Mutante kein Acylphosphat ausbilden kann, die andere N-Bereich-Mutante aber in der Funktion des nucleophilen Angriffs und damit dem zweiten Schritt der Ausbildung einer Peptidbindung deaktiviert ist.

Eine andere mögliche Deutung für die Befunde ist, dass die komplette Funktion zur Bildung von Cyanophycin nur von einem Di- oder höheren Oligomer der Synthetase ausgeführt werden kann. Diese Erklärung würde ohne Annahme einer Diffusion des großen und sterisch anspruchsvollen Phospho-Cyanophycinmoleküls und eines stabilen Zwischenproduktes, dem Acylphosphat, auskommen. Auch native Cyanophycin-Synthetase aus *Anabaena variabilis* könnte als Homodimer vorliegen, wie auch von Ziegler *et al.* (1998) anhand der Retentionszeit an einer kalibrierten Größenausschlusschromatographiesäule vermutet wurde.

Voraussetzung für die Hypothese der Wechselwirkung zweier verschiedener Synthetasemutanten müsste eine räumliche Nähe der funktionellen Reste sein, die möglicherweise auch im Homodimer des Wildtyp-Enzyms eine Funktion hat. Eine solche räumliche Nähe zwischen den sich in der Funktion ergänzenden N-Bereichen von K261G und E298A, bzw. E298A und N392D, könnte auch bedeuten, dass für eine Funktion des Wildtyp-Enzyms ein Dimer vorhanden sein muss oder kann. Im Wildtyp-Enzym könnte über ein kontrolliertes Monomer-Dimer-Gleichgewicht eine Regulation der Aktivität erfolgen. Wenn diese Deutung zutreffend sein sollte, wäre

Cyanophycin-Synthetase als Dimer oder höheres Oligomer aktiv. Es kann zur Zeit keine sinnvolle Aussage über mögliche Kontakte zwischen jeweiligen N-Bereichen oder zwischen C- und N-Bereichen (Kopf-Schwanzkontakt) getroffen werden.

Da Cyanophycin wegen seiner verzweigten Struktur ein sterisch anspruchsvolles Molekül darstellt, ergibt sich die Frage, ob es evtl. einen Transportmechanismus gibt, sodass das Cyanophycinmolekül nicht durch ungerichtete Diffusion in die Position für eine neue Runde des Elongationszyklus kommen muss.

4.3. Alternative Teilstrukturen von Cyanophycin

Die Existenz eines α -verknüpften Polyaspartatrückgrates ist gesichert, weil nach partieller alkalischer Hydrolyse der Isoeptidbindungen Poly- α -Aspartat entstand (Steinbüchel *et al.* 1997), und durch Dünnschichtelektrophorese das durch Cyanophycinase gebildete Abbauprodukt von Cyanophycin als β -Asp-Arg identifiziert wurde (Hejazi 2002).

Die Befunde von Ziegler *et al.* (1998) und Stephan (2000), dass teilweise ein höherer molarer Anteil basischer Aminosäuren als Aspartat im Polymer vorhanden ist, lassen sich aber nicht mit der regulären Struktur von Cyanophycin (Abb. 2) erklären. Cyanophycin aus Cyanobakterien weist ferner eine andere Größenverteilung und teilweise eine andere Aminosäurezusammensetzung als das von heterolog exprimierten Synthetasen gebildete Polymer auf (Abschnitt 1.2.). Außerdem existiert eine Untersuchung über ein Polymer als Produkt eines heterolog in *E. coli* exprimierten Proteins aus *Desulfitobacterium hafniense* mit erheblicher Sequenzähnlichkeit zu CphA, das anders als das cyanobakterielle Cyanophycin in Wasser sehr gut löslich ist, obwohl es einen weitgehend identischen Aufbau besitzt (Ziegler *et al.* 2002).

Es wird deshalb in diesem Abschnitt erörtert, welche alternativen Teilstrukturen mit diesen Befunden korreliert sein könnten, ohne aber die Struktur (Abb. 2) grundsätzlich in Frage zu stellen.

Unterschiedliche Lysin/Arginin-Verhältnisse könnten durch unterschiedliche cytoplasmatische Konzentrationen der Aminosäuresubstrate in den verschiedenen Cyanobakterien und *E. coli* verursacht sein. Wie diese Arbeit zeigt, können Cyanophycin-Synthetasen anstelle von Arginin andere Aminosäuren, wie Lysin, Citrullin oder Ornithin inkorporieren. Unbekannt sind aber die zu unterschiedlichen

Wachstumsbedingungen vorhandenen Substratkonzentrationen in den jeweiligen Organismen.

Cyanophycin besitzt, je nachdem, ob zuletzt Aspartat oder Arginin gebunden wurde, neben den Guanidinogruppen der Argininreste und dem Aminoterminal, zwei oder drei verschiedene freie Carboxylgruppen als einzige funktionelle Gruppen, die für eine Polymerverlängerung in Frage kommen (Abb. 22A).

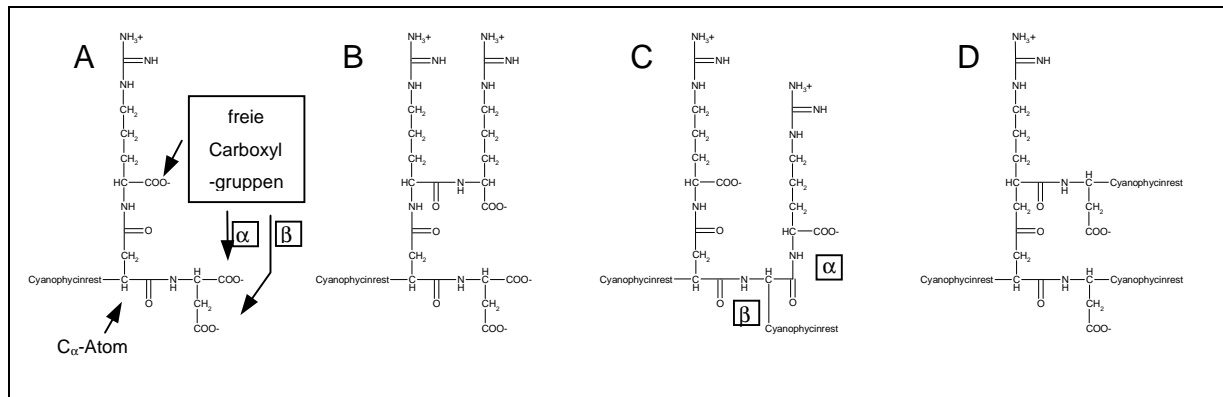


Abbildung 22: Variationen der Struktur von Cyanophycin

4.3.1. Diskussion der Abbildung 22B

Abbildung 22B zeigt die Struktur nach Bildung einer Amidbindung zwischen der freien Carboxylgruppe des regulären Argininrestes und der α -Aminogruppe eines weiteren Argininrestes. Die Entfernungen zwischen dem in Abbildung 22A gekennzeichneten C_{α} -Atom des vorletzten Aspartats und den freien Carboxylgruppen von Arginin oder der β -Carboxylgruppe des C-terminalen Aspartatrestes sind gleich groß. Dies könnte die Ursache für eine zusätzliche Verknüpfung mit Arginin sein, wie sie in Abbildung 22B dargestellt ist.

Ein Beleg für eine solche Reaktion wurde nicht gefunden. Es existieren aber Messungen, nach denen das Verhältnis Arg/Asp bis zu 1,3 sein kann (Stephan 2000, *Synechocystis* PCC 6803 unter Phosphatlimitierung auf NO_3^- als einziger Stickstoffquelle) oder das Verhältnis Asp:Arg:Lys entsprechend 1 : 1,15 : 0,07 (Ziegler *et al.* 1998, heterolog in *E. coli* exprimierte Cyanophycinsynthetase aus *A. variabilis*), was nur mit einer Verknüpfung vereinbar ist, wie sie in Abbildung 22B gezeigt ist.

4.3.2. Diskussion der Abbildung 22C

Eine in Abbildung 22C gezeigte Bindung von Arginin an die α - anstelle der β -Carboxylgruppe ist ebenso vorstellbar. Es würde hier im Vergleich zur regulären Struktur eine Differenz im Abstand von der Länge einer Methylengruppe existieren. Würde die Reaktion der Kettenverlängerung anschließend, wie in Abbildung 22C angedeutet, fortgesetzt, entstünde ein gemischtes α,β -Polyaspartatrückgrat des Polymers, das molare Verhältnis Arg:Asp wäre unverändert 1. Ein einmaliger Einbau von Arginin und ein anschließender Abbruch der Kettenverlängerung würde das Mengenverhältnis von Arginin zu Aspartat nur geringfügig erhöhen (1% bei einer Polymerlänge von 100 Dipeptid-Strukturelementen, entspricht einer Molmasse von 27 kDa).

Eine solche Reaktion könnte durch spontane Umlagerung erfolgen, wenn eine Carboxylgruppe des Aspartatrestes frei ist (Aswad *et al.* 2000) oder möglicherweise durch die Cyanophycin-Synthetase katalysiert werden. Diese hypothetische Teilstruktur wird auch gestützt durch den Befund von Aboulmagd *et al.* (2001), dass α,β -D-L-Polyaspartat für heterolog in *E. coli* exprimierter Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* PCC 6308 eine Primerwirkung besitzt.

4.3.3. Diskussion der Abbildung 22D

Die Strukturvariation mit der möglicherweise größten physikalischen und biologischen Auswirkung ist in Abbildung 22D dargestellt. Nach Bindung eines Aspartatrestes an die Carboxylgruppe von Arginin könnte ein verzweigtes Polymer entstehen. Wie bei der Struktur in Abbildung 22C wäre hier eine Differenz im Abstand vom asymmetrischen C-Atom des Aspartatrestes vorhanden.

Für die Überprüfung der genannten alternativen Reaktionen wären synthetische Primer, denen manche funktionelle Gruppen fehlen, geeignete Instrumente.

4.4. Löslichkeit und Struktur von Cyanophycin

Sämtliche synthetisierten Peptide mit cyanophycinartiger Struktur, wie auch die Aminosäuren Aspartat und Arginin, sind in Wasser gut löslich. Das Polymer Cyanophycin ist in Wasser unlöslich und liegt in den Zellen als Granulum vor. Die Größenverteilung und Menge löslichen Cyanophycins in Cyanobakterien ist unbekannt, da lösliches Cyanophycin weder mikroskopisch, noch durch die von

Simon entwickelte Isolierungsmethode, die auf der Unlöslichkeit bei neutralem pH-Wert beruht, erfasst wird. Nicht bekannt ist ferner, ab welcher Kettenlänge das Polymer unlöslich wird. Falls ab einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa eine Unlöslichkeit einträte, stellt sich mir die Frage, wie Cyanophycin-Synthetase dieses Substrat in das aktive Zentrum gelangen lässt. Ich vermute, dass das C-terminale Ende des Cyanophycins nicht als ungelöst gelten kann, sondern beweglich im Cytoplasma vorliegt, sodass sowohl Cyanophycin-Synthetase als auch das abbauende Enzym Cyanophycinase angreifen können. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Cyanophycingranula (Abb. 1) sind teilweise radiale Kanäle sichtbar. Ob in solchen Kanälen für die Bewegung der Cyanophycin metabolisierenden Enzyme Raum vorhanden ist und dort die reaktiven C-Termini der Cyanophycinmoleküle zugänglich sind, bleibt Spekulation.

Es ist sowohl denkbar, dass jeder Cyanophycinstrang bis zu einer maximalen Kettenlänge synthetisiert wird, als auch dass die Strangsynthesen wiederholt abbrechen und gegebenenfalls wieder aufgenommen werden. Simon (1976) untersuchte an zellfreien Extrakten aus *Anabaena cylindrica* die Größenverteilung und Reaktivität des gesamten aus *A. cylindrica* isolierten Cyanophycins als Substrat der Cyanophycin-Synthetase. Er fand bei allen Cyanophycin-Massen einen Einbau von [³H]-Arginin, d.h. auch bei Cyanophycin mit einer Masse von mehr als 100 kDa. Eine systematische Untersuchung dieser Frage wurde mit gereinigter Synthetase noch nicht durchgeführt.

Ferner ist unbekannt, warum es eine sehr große Varianz der Größe des Polymers gibt. Bei heterolog exprimierten Synthetasen entsteht in allen bekannten Fällen ein Polymer mit der Größe zwischen 25 und 30 kDa, in Cyanobakterien beträgt die Größe zwischen 25 und bis zu 130 kDa (Simon 1976, *Anabaena cylindrica*, Hai *et al.* 1999, *Synechococcus* MA19). Unterhalb dieser Molmasse ist Cyanophycin möglicherweise löslich. Das Löslichkeitsverhalten von Cyanophycin könnte aus mehreren Gründen variabel sein:

- Aminosäure-Zusammensetzung
- Modifikationen des Polymers
- Variationen in der Struktur des Cyanophycins
- zelluläre Faktoren, die die Löslichkeit von Cyanophycin beeinflussen
- Sekundärstruktur von Cyanophycin

Ab einer Kettenlänge von 25 kDa ist zumindest ein Teil des aus verschiedenen Organismen gewonnenen Cyanophycins unlöslich, denn es wurde als in Säure löslicher und bei neutralem pH-Wert unlöslicher Stoff isoliert. Es findet aber teilweise eine Elongation bis zu einer Masse von 30 kDa statt. Warum endet die Elongation dann aber teilweise bei einer Moleküllänge von 25 kDa wegen möglicher Unlöslichkeit von Cyanophycin, während andere Moleküle bis zu einer Größe von 30 kDa verlängert werden? Die einfachste Erklärung für die entstehende Molekülgröße ist, dass Cyanophycin, zumindest im Bereich seiner Synthese, als löslich betrachtet werden darf. Zum Ende der Synthese könnten sich Synthetase und Polymer aus unbekannten Gründen voneinander trennen, das Polymer könnte durch langsame Faltung ausfallen. Die Existenz von Cyanophycin mit größerem, „natürlichem“ Molekulargewicht in Cyanobakterien könnte durch zelluläre Faktoren, die die Trennung von Synthetase und Polymer verhindern, verursacht werden. Eine systematische Untersuchung dieser Frage, wie z.B. auch ein denkbarer Einfluss der Ionenstärke, wurde von mir nicht durchgeführt.

Das von Ziegler *et al.* (2002) untersuchte, dem Cyanophycin sehr ähnliche Polymer, das von einer heterolog exprimierten Synthetase aus *D. hafniense* in *E. coli* gebildet wurde, ist im Gegensatz zu Cyanophycin sehr gut in Wasser löslich. Der relativ hohe Lysingehalt dieses Polymers (ca. 10% der basischen Aminosäuren) kann nicht allein als Erklärung für die gute Wasserlöslichkeit dienen, denn es existieren Aminosäureanalysen von Cyanophycin, die einen ebenso hohen Lysingehalt, aber klassisches (Un-) Löslichkeitsverhalten belegen (Krehenbrink *et al.* 2002, heterolog in *E. coli* exprimierte Cyanophycin-Synthetase aus *Synechocystis* PCC 6308). Die Struktur des von der Synthetase aus *D. hafniense* synthetisierten Polymers ist dem prinzipiellen Modell (Abb. 2) sehr ähnlich. Ziegler *et al.* fanden neben dem relativ hohen Lysinanteil nach Verdau des Polymers mit Cyanophycinase aus *A. variabilis* ATCC 29413 ein Tetrapeptid Asp₂Arg₂. Ziegler *et al.* schlugen deshalb als mögliche Erklärung der veränderten Löslichkeitseigenschaften eine teilweise verzweigte Struktur analog Abbildung 22D (Abschnitt 4.3.) vor.

4.5. Keine *in vitro*-Cyanophycin-Synthese ohne Primer

In vivo kann Cyanophycin von verschiedenen Organismen *de novo* synthetisiert werden. *In vitro* gelang lediglich eine Elongationsreaktion zugesetzter Primer. Die Existenz eines *in vivo* für eine Elongation notwendigen Primers und seine spekulative

Struktur wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt. Der Fakt, dass Cyanophycin von verschiedenen Prokaryoten bei heterologer Expression der Cyanophycin-Synthetase gebildet werden kann, legt die Vermutung nahe, dass es *in vivo* keinen spezifischen Primer gibt, da er sowohl in allen untersuchten Cyanobakterien als auch in den für die heterologen Expressionen verwendeten Wirts-Organismen vorhanden sein müsste.

Hai *et al.* (2001) erzielten bei ihren Versuchen zur Substratspezifität der Cyanophycin-Synthetase aus *Synechococcus* sp. strain MA 19 teilweise andere Ergebnisse. Im Gegensatz zu mir (Abb. 10, Spur 12) erzielten sie mit dem Dipeptid α -Arg-Asp eine *in vitro*-Primerwirkung, d.h. es fand eine zumindest durch den Einbau radiomarkierten Arginins gemessene Synthese von Cyanophycin statt. Mit α -Arg-Asp einer anderen Charge hingegen wurde keine Synthese beobachtet. Außerdem fanden sie eine Primerwirkung bei gleichzeitiger Verwendung von Cyanophycin-Synthetase als Rohextrakt zusammen mit Membranbestandteilen aus *Synechococcus* PCC 7942 oder einem Polyaspartanteile enthaltenden Exo-Protein aus *Klebsiella*, was allerdings mit gereinigtem Enzym nicht bestätigt werden konnte. Die Autoren schlugen deshalb vor, dass strukturbildende Moleküle als eine Art „Kristallisationskeim“ für die *in vitro*-Synthese von Cyanophycin dienen könnten.

Möglich wäre auch, dass eine *in vitro*-Synthese von Cyanophycin, besonders bei der Verknüpfung der ersten Aminosäuren, entweder unbekannte Reaktionsbedingungen erfordert oder am Anfang sehr langsam erfolgt. Verkürzte synthetische Primer wie (DR)-D, (DR)₂ oder (DR)₂-D könnten Aufschluss über die minimale Struktur von *in vitro* aktiven Primern geben. Sie wurden im Verlauf dieser Arbeit nicht synthetisiert.

4.6. Diskussion der Substratspezifität

Nur α -Aminosäuren mit basischer Funktion der Seitenkette werden, soweit mir bekannt, als Substrat ersatzweise für Arginin akzeptiert. Die Aminosäurezusammensetzung von Cyanophycin in Cyanobakterien ist stark abhängig von den verwendeten Kultivierungsbedingungen (Stephan *et al.* 2000, persönliche Mitteilung von Martin Krehenbrink), dem eingesetzten Vektorsystem (Krehenbrink *et al.* 2002), der Herkunft des Gens, sowie dem Bakterienstamm, in dem diese Vektoren zur Expression gebracht werden.

Die Aminosäuren Lysin, Citrullin und Ornithin konnten zwar anstelle der Aminosäure Arginin eingebaut werden (Abschnitt 6.2.1., Spektren 11 bis 15), es entstand aber keine für eine Färbung mit Coomassie ausreichende Menge Polymer (Abb. 12, Abschnitt 3.6.). Für Lysin enthaltende Peptide wurde eine weitere Reaktion mit Aspartat nachgewiesen (Abschnitt 6.2.1., Spektrum 11), für ein Citrullin enthaltendes Peptid konnte keine weitere Verlängerung gefunden werden (Abschnitt 6.2.1., Spektrum 14).

Die Ergebnisse von Merritt *et al.* (1994) und Wingard *et al.* (2002), dass Glutamat in *Synechocystis* PCC 6308 und *Synechococcus* sp. strain G2.1 ein Bestandteil von Cyanophycin sein kann, konnten innerhalb dieser Arbeit für das von der Cyanophycin-Synthetase aus *A. variabilis* produzierte Polymer nicht bestätigt werden.

4.7. Physiologische Bedeutung von Cyanophycin

Die physiologische Funktion von Cyanophycin ist bis heute nicht gut charakterisiert.

Der Fakt, dass sehr viele Cyanobakterien unter ATP-Verbrauch Cyanophycin produzieren können, legt die Vermutung nahe, dass die Produktion von Cyanophycin diesen Arten einen Vorteil verschafft. Der Befund von Ziegler *et al.* (2001), dass eine ΔCphA -Mutante von *Anabaena variabilis* unter gewöhnlichen Laborbedingungen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp zeigt, lässt keine eindeutigen Schlüsse über die physiologische Relevanz zu. Unterschiede im Wachstum wurden lediglich unter Hochlichtbedingungen gefunden ($250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), die aber auch durch Einstrahlung des Sonnenlichtes erreicht werden können. Unter den gleichen Anzuchtbedingungen wies eine ΔPsbO -Mutante in *Synechocystis* PCC 6803, bei der die Wasserspaltung des Photosystems II reduziert ist, ein Wachstum auf Arginin als alleiniger Stickstoffquelle auf (Stephan 2000 & Stephan *et al.* 2000), wohingegen Wildtyp-*Synechocystis* nicht dauerhaft überlebensfähig war. Dieser Effekt wurde durch Wachstum auf zusätzlich angebotenem NO_3^- aufgehoben. Die phänotypischen Befunde der Untersuchungen der ΔCphA -Mutante bzw. der ΔPsbO -Mutante ließen die Autoren deshalb einen Zusammenhang zwischen Cyanophycin-Akkumulation und Photosynthese oder Redoxzustand der Zelle vermuten. In Laborkulturen wird Cyanophycin im allgemeinen in der stationären Wachstumsphase gefunden, also bei unter limitierenden Bedingungen wachsenden Kulturen. Licht könnte hier ein limitierender Faktor sein.

Bockholt *et al.* (1996) stellten fest, dass die kein Cyanophycin produzierenden Stämme *Synechococcus* PCC 6301 und 7942 eine starke L-Aminosäure-Oxidase-Aktivität mit hoher Spezifität für Arginin haben. Die Cyanophycin produzierende Art *Synechocystis* PCC 6803 baut Arginin demgegenüber hauptsächlich über den Arginaseweg ab (Quintero *et al.* 2000). Stephan (2000) schlug vor, dass eine starke Akkumulation von Cyanophycin eintritt, wenn eine hohe intrazelluläre Arginkonzentration im Verhältnis zu einer niedrigen gesamten Stickstoffmenge in der Zelle vorliegt. Die Cyanophycin-Synthese könnte also einer Arginin-Entgiftung dienen.

Für eine einfache Deutung der Regulation des Cyanophycin- bzw. des gesamten Stickstoffhaushaltes von Cyanobakterien mangelt es noch an Untersuchungen, die die verschiedenen Ergebnisse korrelieren. Eine Möglichkeit für eine Regulation der Cyanophycin-Akkumulation erhielt im Rahmen dieser Arbeit eine leichte Stützung: Cyanophycinsynthetase ist eventuell als Dimer aktiv, wie die Komplementierungsversuche (Abschnitt 4.2.) zeigten.

Weiteren Aufschluss über Expression der Cyanophycin metabolisierenden Enzyme, sowie über die Regulation des Metabolismus von Stickstoff enthaltenden Verbindungen könnten automatisierte Methoden geben, bei denen die Veränderungen im Proteom von Wildtyp-Kulturen, sowie das von ausgewählten mutierten Organismen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, quantitativ untersucht würden. Notwendig wäre zudem Kenntnisse der Regulation der um die Substrate und ihre Vorläufer konkurrierenden Reaktionen und der jeweiligen Substratkonzentrationen.

Möglicherweise könnten die Konzentrationen der Substrate der Cyanophycin-Synthetase sowie ihrer Vorläufer eine ausreichende Erklärung für das nicht verstandene Auftreten der Cyanophycingranula bieten.

5. Literaturverzeichnis

Aboulmagd, E., Oppermann-Sanio, F.B., Steinbüchel, A. (2000) Molecular characterisation of the cyanophycin synthetase from *Synechocystis* sp. strain PCC 6308, Archives of Microbiology **174**, 297-306.

Aboulmagd, E., Oppermann-Sanio, F.B., Steinbüchel, A. (2001) Purification of *Synechocystis* sp. PCC 6308 cyanophycin synthetase and its characterisation with respect to substrate and primer specificity, Applied and Environmental Microbiology **67** (5), 2176-2182.

Allen, M.M. (1984) Cyanobacterial cell inclusions, Annual Review of Microbiology **38**, 1-25.

Allen, M.M., Morris, R., Zimmermann, W. (1984) Cyanophycin granule polypeptide protease in a unicellular cyanobacterium, Archives of Microbiology **138**, 119-123.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipmann, D.J. (1990) Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology **215** (3), 403-410.

Anderson, M.S., Eveland, S.S., Onishi, H.R., Pompliano, D.L. (1996) Kinetic mechanism of the *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-Alanyl-D-Alanine-adding enzyme: use of a glutathion S-transferase fusion, Biochemistry **35**, 16264-16269.

Ariño, X., Ortega-Calvo, J.-J., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C. (1995) Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeotheca* sp. PCC 6909, Archives of Microbiology **163**, 447-453.

Aswad, D.W., Paranandi, M.V., Schurter, B.T. (2000) Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **21**, 1129-1136.

Baumgärtel, O. (1920) Das Problem der Cyanophyceenzelle, Archiv für Protistenkunde **41**, 50-141.

Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W., Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers, European Journal of Biochemistry **267**, 5561-5570.

Bertrand, J.A., Auger, G., Fanchon, E., Martin, L., Blanot, D., van Heijenoort, E., Dideberg, O. (1997) Crystal structure of UDP-*N*-acetylmuramoyl-L-alanine:D-glutamate ligase from *Escherichia coli*, The EMBO Journal **16** (12), 3416-3425.

Bertrand, J.A., Auger, G., Fanchon, E., Martin, L., Fanchon, E., Blanot, D., Le Beller, D., van Heijenoort, E., Dideberg, O. (1999) Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes, *Journal of Molecular Biology* **289**, 579-590.

Bertrand, J.A., Fanchon, E., Martin, L., Chantalat, L., Auger, G., Blanot, D., Heijenoort, J., Dideberg, O. (2000) „Open“ structure of MurD: domain movements and structural similarities with folylpolyglutamate synthetase, *Journal of Molecular Biology* **301**, 1257-1266.

Bielinska, A.U., Chen, C., Johnson, J., Baker, J.R.Jr. (1999) DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection, *Bioconjugate Chemistry* **10**, 843-850.

Blanchard, C.Z., Lee, Y.M., Frantom, P.A., Waldrop, G.L. (1999) Mutations at four active site residues of biotin carboxylase abolish substrate-induced synergism by biotin, *Biochemistry* **38**, 3393-3400.

Bockholt, R., Scholten-Beck, G., Pistorius, E.K. (1996) Construction and partial characterization of an L-amino acid oxidase-free *Synechococcus* PCC 7942 mutant and localisation of the L-amino acid oxidase in the corresponding wild type, *Biochimica et Biophysica Acta* **1307**, 111-121.

Borzi, A. (1887) Le comunicazioni intracellulari delle Nostochinee, *Malpighia* **1**, 28-74.

Bouhss, A., Mengin-Lecreux, D., Blanot, D., van Heijenoort, J., Parquet, C. (1997), Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-Alanine ligase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **36**, 11556-11563.

Bouhss, A., Dementin, S., Parquet, C., Mengin-Lecreux, D., Bertrand, J.A., Le Beller, D., Dideberg, O., van Heijenoort, J., Blanot, D. (1999) Role of the ortholog and paralog amino acid invariants in the active site of the UDP-MurNAc-L-alanine:D-glutamate ligase (MurD), *Biochemistry* **38**, 12240-12247.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.

Braune, W., Döhler, G. (1996) ¹⁵N-uptake, influenced by UV-B radiation, and pattern of amino-acid pools during akinete germination in *Anabaena variabilis* (cyanobacteria), *Journal of Basic Microbiology* **4**, 219-227.

Bruice, T.C., Lightstone, F.C. (1999) Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions, *Accounts of Chemical Research* **32**, 127-136.

Carr, N.G. (1988) Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria. In: *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*, Rogers, L.J., Gallon, R.J. (eds.), 13-21, Clarendon Press, Oxford.

Chua, N.-H., Piccioni, R., Bellmare, G. (1982) In: *Methods in chloroplast molecular biology*, Edelman, M., Hallik, R.B., Chua, N.-H. (editors), Elsevier, Amsterdam, 985-1014.

Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A., Stalon, V. (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria, *Microbiology Reviews* **50**, 314-352.

Deyrup, A.T., Krishnan, S., Cockburn, B.N., Schwartz, N.B. (1998) Deletion and site-directed mutagenesis of the ATP-binding motif (P-loop) in the bifunctional murine ATP-sulfurylase/Adenosine 5'-phosphosulfate kinase enzyme, *The Journal of Biological Chemistry* **273** (16), 9450-9456.

Dittmann, E., Neilan, B.A., Börner, T. (2001) Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology* **57**, 467-473.

Döhren, H. von, Keller, U., Vater, J., Zocher, R. (1997) Multifunctional Peptide Synthetases, *Chemical Reviews* **97**, 2675-2705.

Duclos B., Marcandier S., Cozzone A.J. (1991) Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis, *Methods in Enzymology* **201**, USA, 10-21, Academic Press, San Diego.

Ebert, J. (2001) Reinigung und Charakterisierung der Multi-L-Arginyl-poly-L-Aspartat-Synthetase (Cyanophycin Synthetase) von *Synechococcus elongatus*, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin.

Esser, L., Wang, C.-R., Hosaka, M., Smagula, C.S., Südhof, T.C., Deisenhofer, J. (1998) Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes, *EMBO Journal* **17** (4), 977-984.

Eveland, S.S., Pompliano, D.L., Anderson, M.S. (1997) Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to region conserved among murein and folyl poly-γ-glutamate ligases: identification of a ligase superfamily, *Biochemistry* **36**, 6223-6229.

Fan, C., Moews, P.C., Shi, Y., Walsh, C.T., Knox, J.R. (1995) A common fold for peptide synthetases cleaving ATP to ADP: Glutathion synthetase and D-alanine:D-alanine ligase of *Escherichia coli*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 1172-1176.

Fernández-Piñas, Mateo, P., Bonilla, I. (1995) Ultrastructural changes induced by selected cadmium concentrations in the cyanobacterium *Nostoc* UAM 208, *Journal of Plant Physiology* **147**, 452-456.

Fogg, G.E. (1951) Growth and heterocyst production in *Anabaena cylindrica* Lemm., Annals of Botany **15** (57), 23-35.

Fredriksson, C., Bergman, B. (1997) Ultrastructural characterisation of cells specialised for nitrogen fixation in a non-heterocystous cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., Protoplasma **197**, 76-85.

Frey, K.M., Oppermann-Sanio, F.B., Schmidt, H., Steinbüchel, A. (2002) Technical scale production of cyanophycin with recombinant strains of *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, **68** (7), 3377-3384.

Galperin, M.Y., Koonin, E.V. (1997) A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity, Protein Science **6**, 2639-2643.

Görl, M., Sauer, J., Baier, T., Forchhammer, K. (1998) Nitrogen starvation-induced chlorosis in *Synechocystis* PCC 7942: adaption to long-term survival. Microbiology **144**, 2449-2458.

Gupta, M., Carr, N.G. (1981) Enzyme activities related to cyanophycin metabolism in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* spp., Journal of General Microbiology **125**, 17-23.

Hai, T., Oppermann-Sanio, F.B., Steinbüchel, A. (1999) Purification and characterization of cyanophycin and cyanophycin synthetase from the thermophilic *Synechococcus* sp. MA 19, FEMS Microbiology Letters **181**, 229-236.

Hai, T., Oppermann-Sanio, F.B., Steinbüchel, A. (2002) Molecular characterisation of a thermostable cyanophycin synthetase from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain MA19 and *in vitro* synthesis of cyanophycin and related polyamides, Applied and Environmental Microbiology **68** (1), 93-101.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, Journal of Molecular Biology **166**, 557-580.

Hegler, R. (1901) Untersuchungen über die Organisation der Phycocromaceenzelle, Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik, 234-311.

Hejazi M., Piotukh K., Mattow J., Deutzmann R., Volkmer-Engert R., Lockau W. (2002) Isoaspartyl dipeptidase activity of plant-type asparaginases, Biochemical Journal **364**, 129-136.

Hejazi, M. (2002) Cyanophycin-Degradation in Cyanobakterien: Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Cyanophycinase und einer Isoaspartyl-Dipeptidase, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.

Herdman, M. (1988) Cellular differentiation: akinetes, *Methods in Enzymology* **167**, 222-232.

Jäger, K.M., Johansson, C., Kunz, U., Lehmann, H. (1996) Sub-cellular element analysis of a cyanobacterium (*Nostoc* sp.) in symbiosis with *Gunnera manicata* by ESI and EELS, *Botanica Acta* **110**, 151-158.

Jiang, F., Wisen, S., Widersten, M., Bergman, B., Mannervik, B. (2000) Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by in vitro selection of DNA sequences from a random library, *Journal of Molecular Biology* **301**, 783-793.

Kleinkauf H., von Döhren, H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis, *European Journal of Biochemistry* **236**, 335-351

Korzhenevskaya, T.G., Gorelova, O.A., Baulina, O.I., Gusev, M.V. (1999) Accumulation of reserve polymers by *Nostoc muscorum* CALU 304 cells grown in mixed cultures with plant tissue, *Microbiology* **68** (2), 158-163.

Krehenbrink, M., Oppermann-Sanio, F.-B., Steinbüchel, A. (2002) Evaluation of non-cyanobacterial genome sequences for occurrence of genes encoding proteins homologous to cyanophycin synthetase and cloning of an active cyanophycin synthetase from *Acinetobacter* sp. strain DSM 587, *Archives of Microbiology* **177** (5), 371-80.

Kunioka, M. (1997) Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms, *Applied Microbiology in Biotechnology* **47**, 469-475.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.

Lang, N.J., Simon, R.D., Wolk, P. (1972) Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*, *Archives of Microbiology* **83**, 313-320.

Lawry, N.H., Simon, R.D. (1982) The normal and induced occurrence of cyanophycin inclusion bodies in several blue-green algae, *Journal of Phycology* **18**, 391-399.

Leganés, F., Fernández-Piñas, F., Wolk, C.P. (1998) A transposition-induced mutant of *Nostoc ellipsosporum* implicates an arginine-biosynthetic gene in the formation of cyanophycin granules and of functional heterocysts and akinetes, *Microbiology* **144**, 1799-1805.

Li, H., Sherman, D.M., Bao, S., Sherman, L.A. (2001) Pattern of cyanophycin accumulation in nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing cyanobacteria, *Archives of Microbiology* **176**, 9-18.

- Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, r., Houmard, J., Tandeau de Marsac, N.** (1996) Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium, *Microbiology* **142**, 611-622.
- Mackerras, A.H., De Cazal, N.M, Smith, G.D.** (1990) Transient accumulation of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308, *Journal of General Microbiology* **136**, 2057-2065.
- Merritt, M.V. Sid, S.S., Mesh, L., Allen, M.M.** (1994) Variations in the amino-acid-composition of cyanophycin in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6308 as a function of growth-conditions. *Archives of Microbiology* **162** (3), 158-166.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C., Florencio, F.J.** (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels, *The Journal of Biological Chemistry* **276** (41), 38320-38328.
- Murzin, A.G.** (1996) Structural classification of proteins: new superfamilies, *Current Opinion in Structural Biology* **6**, 386-394.
- Newman J., Wyman, M., Carr, N.G.** (1987) Absence of the nitrogen reserve polymer cyanophycin from marine *Synechococcus* species, *FEMS Microbiology Letters* **44**, 221-224.
- Newton, J.W., Tyler D.D.** (1987) Cyanophycin granule polypeptide in a facultatively heterotrophic cyanobacterium, *Current Microbiology* **15**, 207-211.
- Nichols, J.M., Adams, D.G. Carr, N.G.** (1980) Effect of canavanine and other amino acid analogues on akinete formation in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, *Archives of Microbiology* **127**, 67-75.
- Obst, M., Oppermann-Sanio, F.B., Luftmann, H., Steinbüchel, A.** (2002) Isolation of cyanophycin degrading bacteria – cloning and characterisation of an extracellular cyanophycinase gene (*cphE*) from *Pseudomonas anguilliseptica* strain BI, *Journal of Biological Chemistry* **277** (28), 25096-25105.
- Oppermann-Sanio, F.B., Steinbüchel, A.** (2002) Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production, *Naturwissenschaften* **89** (1), 11-22.
- Parnas, H., Cohen, D.** (1976) The optimal strategy for the metabolism of reserve materials in microorganisms, *Journal of Theoretical Biology* **56**, 19-55.
- Quintero, M.J., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., Flores, E.** (2000) Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* Sp. strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway, *Journal of Bacteriology* **182** (4), 1008-1015.

- Richter, R., Hejazi, M., Kraft, R., Ziegler, K., Lockau, W.** (1999) Cyanophycinase, a peptidase degrading the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): Molecular cloning of the gene of *Synechocystis* sp. PCC 6803, expression in *Escherichia coli*, and biochemical characterisation of the purified enzyme, *European Journal of Biochemistry* **163**, 163-169.
- Romans, K.M., Carpenter, E.J., Bergman, B.** (1994) Bouyancy regulation in the colonial diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium tenue*: ultrastructure and storage of carbohydrate, polyphosphate, and nitrogen, *Journal of Phycology* **30**, 935-942.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.
- Saraste, M., Sibbald, P.R., Wittinghofer, A.** (1990) The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins, *Trends in Biological Sciences* **15**, 430-434.
- Schneegurt, M.A., Tucker, D.L., Ondr, J.K., Sherman, D.M., Sherman, L.A.** (2000) Metabolic rhythms of a diazotrophic cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142, heterotrophically grown in continuous dark, *Journal of Phycology* **36** (1), 107-117.
- Sheng, Y., Sun, X., Shen, Y., Bogner, A.L., Baker, E.N., Smith, C.A.** (2000) Structural and functional similarities in the ADP-forming amide bond ligase superfamily: implications for a substrate-induced conformational change in folylpolyglutamate synthetase, *Journal of Molecular Biology* **302**, 427-440.
- Sherman, L., A., Meunier, P., Colón-Lopez, M., S.** (1998) Diurnal rhythms in metabolism: a day in the life of a unicellular, diazotrophic cyanobacterium, *Photosynthesis Research* **58**, 25-42.
- Sherman, D., Tucker, D., Sherman, L.A.** (2000) Heterocyst development and localisation of cyanophycin in N₂-fixing cultures of *Anabaena* sp. PCC 7120 (cyanobacteria), *Journal of Phycology* **36**, 932-941.
- Sili, C., Ena, A., Materassi, R.** (1994) Germination of desiccated aged akinetes of alkaliphilic cyanobacteria, *Archives of Microbiology* **162**, 20-25.
- Simon, R.D.** (1971) Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68** (2), 265-267.
- Simon R.D.** (1973) The effect of Chloramphenicol on the production of cyanophycin granule polypeptide in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*, *Archiv für Mikrobiologie* **92**, 115-122.

Simon, R.D., Weathers, P. (1976) Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria, *Biochimica et Biophysica Acta* **420**, 165-176.

Simon, R.D. (1976) The biosynthesis of multi-L-arginyl-poly (L-aspartic acid) in the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*, *Biochimica et Biophysica Acta* **422**, 407-418.

Simon, R.D., Lawry, N.H., McLendon, G.L. (1980) Structural characterisation of the cyanophycin granule polypeptide of *Anabaena cylindrica* by circular dichroism and Raman spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta* **626**, 277-281.

Simon, R.D. (1987) Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, In: *The cyanobacteria*, Fay, P., Van Baalen, C. (eds.), 199-225, Elsevier Science Publishers (Biomedical Division).

Sloane, V., Blanchard, C.Z., Guillot, F., Waldrop, G.L. (2001) Site-directed mutagenesis of ATP binding residues of biotin carboxylase, *Journal of Biological Chemistry* **276** (27), 24991-24996.

Stanier, R.Y., Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria, *Annual Reviews of Microbiology* **31**, 225-274.

Steinbüchel, A., Hai, T., Oppermann, F.B., Joentgen, W., Groth, T. (1997) Herstellung von Poly- α -asparaginsäure-Natriumsalz durch alkalische Hydrolyse des nativen Polypeptides Cyanophycin, Patentanmeldung Le A 32 341.

Stephan, D.P. (2000) Wechselbeziehungen zwischen Cyanophycin-Synthese, L-Arginin-Katabolismus und Photosynthese in dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803, Dissertation, Universität Bielefeld.

Stephan, D.P., Ruppel, H., G., Pistorius, E. K. (2000) Interrelation between cyanophycin synthesis, L-arginine catabolism and photosynthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, *Zeitschrift für Naturforschung* **55c**, 927-942.

Stevens, S.E.jr., Paone, D.A.M., Balkwill, D.L. (1981) Accumulation of cyanophycin as a result of phosphate limitation in *Agmenellum quadruplicatum*, *Plant Physiology* **67**, 716-719.

Surosz, W., Palinska, K.A. (2000) Ultrastructural changes induced by selected cadmium and copper concentrations in the cyanobacterium *Phormidium*: interaction with salinity, *Journal of Plant Physiology* **157**, 643-650.

Szczepanek, S., Cikala Mihai, David, C.N. (2001) Poly- γ -glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in *Hydra*, *Journal of Cell Science* **115**, 745-751.

Thoden, J.B., Kappock, J., Stubbe, J., Holden, H.M. (1999) Three-dimensional structure of N^5 -carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthetase: a member of the ATP grasp protein superfamily, *Biochemistry* **38**, 15480-15492.

Thoden, J.B., Blanchard, C.Z., Holden, H.M., Waldrop, G.L. (2000) Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP-binding, *Journal of Biological Chemistry* **275** (21), 16183-16190.

Tischer, I. (1957) Untersuchungen über die granulären Einschlüsse und das Reduktions-Oxidations-Vermögen der Cyanophyceen, *Archiv für Mikrobiologie* **27**, 400-428.

Toy, J., Bognar, A.L. (1994) Mutagenesis of the *Lactobacillus casei* Polyglutamate synthetase gene at essential residues resembling an ATP binding site, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **314** (2), 344-350.

Vázquez-Bermúdez, M.F., Flores, E., Herrero, A. (2002) Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes, *Biochimica et Biophysica Acta* **1578**, 95-98.

Weathers, P.J., Chee, H.L., Allen, M.M. (1978) Arginine catabolism in *Aphanocapsa* 6308, *Archives of Microbiology* **118**, 1-6.

Wingard, L.L., Miller, S.R., Sellker, J.M.L., Stenn, E., Allen, M.M., Wood, A.M. (2002) Cyanophycin production in a phycoerythrin-containing strain of unusual phylogenetic affinity, *Applied and Environmental Microbiology* **68** (4), 1772-1777.

Wolk, C.P., Ernst, A., Elhai, J. (1994) Heterocyst metabolism and development, in: Bryant, D.A., *The molecular biology of cyanobacteria*, 769-823, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Yamaguchi, H., Kato, H., Hata, Y., Nishioka, T., Kimura, A., Oda, J., Katsube, Y. (1993) Three-dimensional structure of the glutathione synthetase from *Escherichia coli* B at 2.0 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* **229**, 1083-1100.

Yan, Y., Munshi, S., Leiting, B., Anderson, M.S., Chrzas, J., Chen, Z. (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* **304**, 435-445.

Yoon, H., Do, J.H., Lee, S.Y., Chang, H.N. (2000) Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Letters* **22**, 585-588.

Ziegler, K., Diener, A., Herpin, C., Richter, R., Deutzmann, R., Lockau, W. (1998) Molecular characterization of cyanophycin synthetase, the enzyme catalyzing the biosynthesis of the cyanobacterial reserve material multi-L-arginyl-poly-L-aspartate (cyanophycin), *European Journal of Biochemistry* **254**, 154-159.

Ziegler, K., Stephan, D.P., Pistorius, E.K., Ruppel, H.G., Lockau, W. (2001) A mutant of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 lacking cyanophycin synthetase: growth properties and ultrastructural aspects, *FEMS Microbiology Letters* **196**, 13-18.

Ziegler, K., Deutzmann, R., Lockau, W. (2002) Cyanophycin synthetase-like enzymes of non-cyanobacterial eubacteria: characterisation of the polymer produced by a recombinant synthetase of *Desulfitobacterium hafniense*, *Zeitschrift für Naturforschung* **57c**, 522-529.

6. Anhang

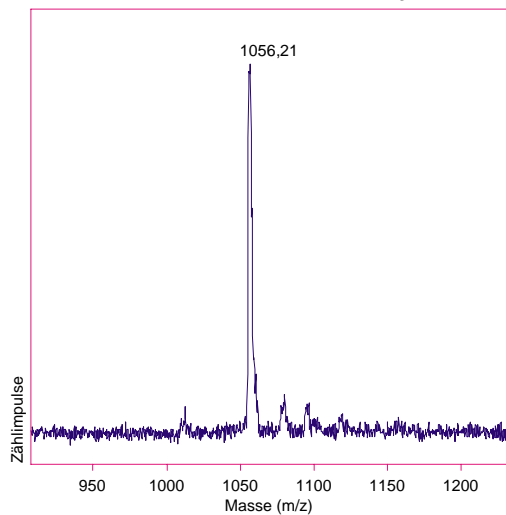
6.1. Berechnete mittlere Molmassen

Tabelle 14:

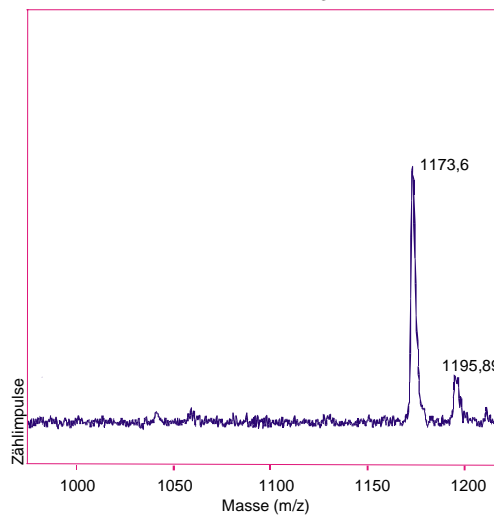
	Molmasse (neutral)	Molmasse (einfach protoniert)
(DR) ₃	831,8 Da	832,8 Da
(DR) ₃ -D	946,9 Da	947,9 Da
(DR) ₃ -(Ahx) ₂	1058,1 Da	1059,1 Da
(Ahx) ₂ -(DR) ₃	1057,1 Da	1058,1 Da
(DR) ₃ -(Ahx) ₂ -D	1173,1 Da	1174,1 Da
(Ahx) ₂ -(DR) ₃ -D	1172,1 Da	1173,1 Da
(DR) ₄	1103,1 Da	1104,1 Da
(DR) ₃ -D-D	1061,9 Da	1062,9 Da
(DR) ₃ -R	988,0 Da	989,0 Da
(DR) ₄ -R	1259,3 Da	1260,3 Da
(DR) ₃ -D-Lys	1074,1 Da	1075,1 Da
(DR) ₃ -D-Lys-D	1190,2 Da	1191,2 Da
(DR) ₃ -D-Orn	1060,0 Da	1061,0 Da
(DR) ₃ -D-Cit	1104,1 Da	1105,1 Da
(DR) ₃ -D-Cit-D	1219,1 Da	1220,1 Da
(DR) ₃ -Glu	958,1 Da	959,1 Da
(DR) ₅	1374,4 Da	1375,2 Da
(DR) ₆	1645,7 Da	1646,7 Da
(DR) ₇	1917,0 Da	1918,0 Da
(DR) ₈	2198,3 Da	2199,3 Da
(DR) ₉	2459,6 Da	2460,6 Da
(DR) ₁₀	2730,9 Da	2731,9 Da

6.2. Dokumentation der MALDI-Massenspektren

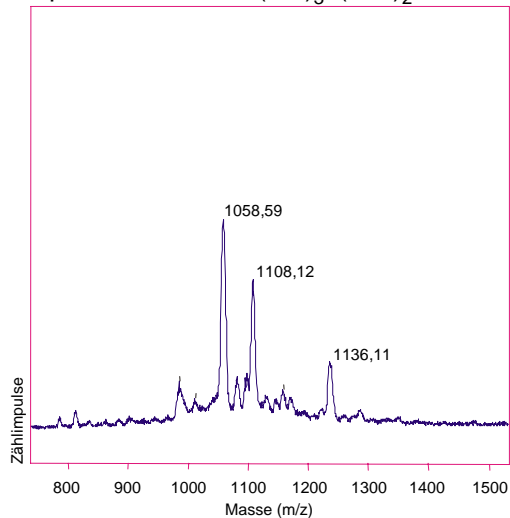
Spektrum 1: Edukt $(\text{Ahx})_2-(\text{DR})_3$



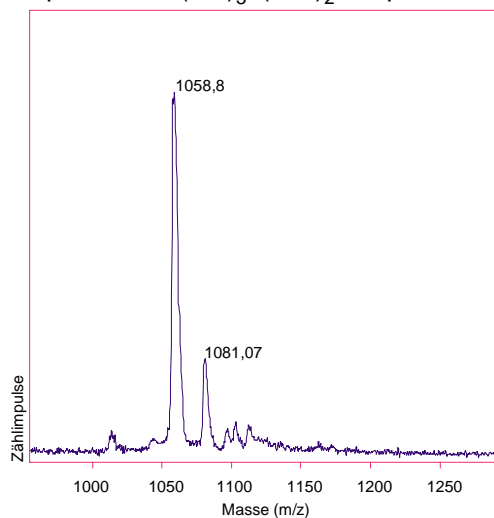
Spektrum 2: $(\text{Ahx})_2-(\text{DR})_3+\text{Asp}$



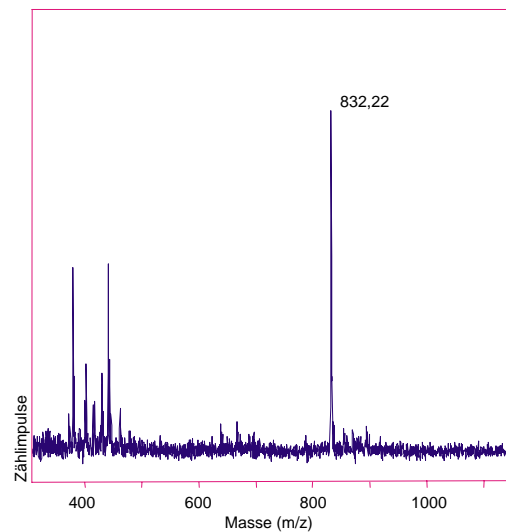
Spektrum 3: Edukt $(\text{DR})_3-(\text{Ahx})_2$



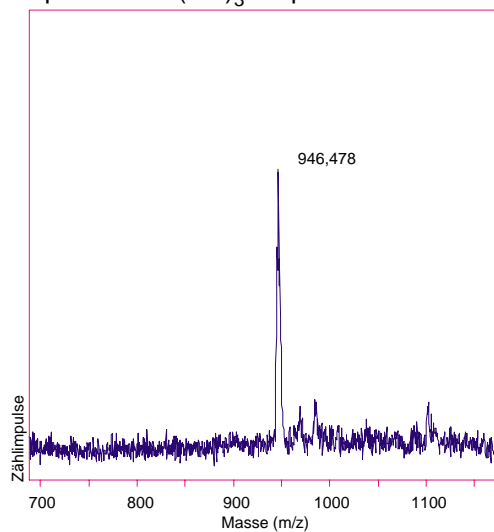
Spektrum 4: $(\text{DR})_3-(\text{Ahx})_2+\text{Asp}$

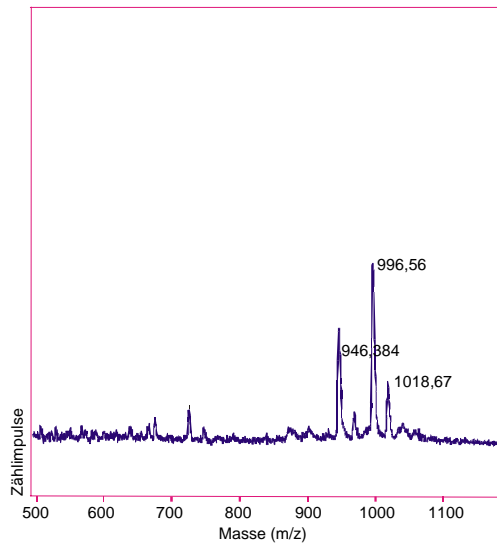
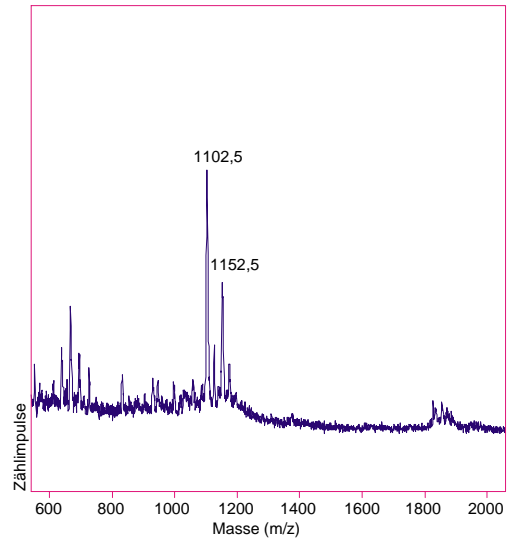
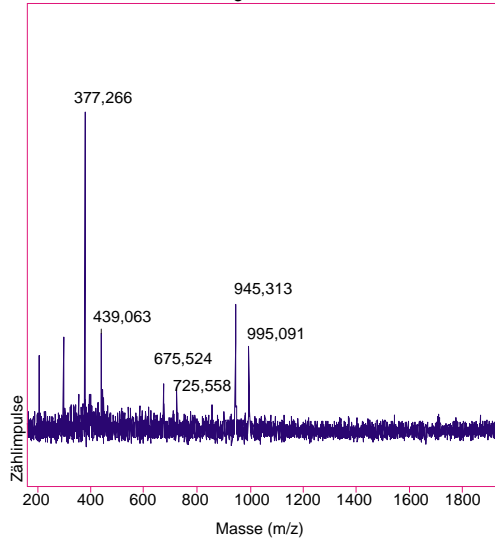
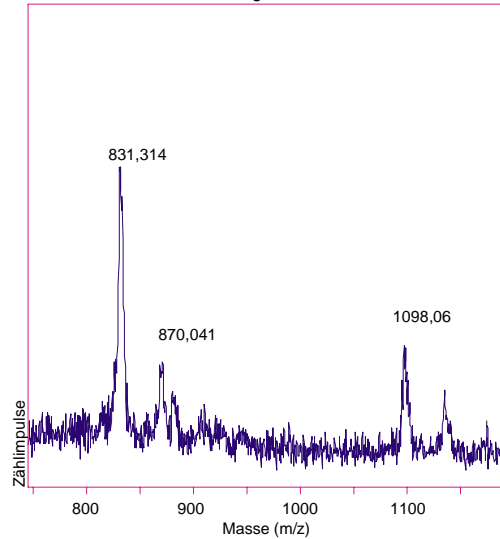
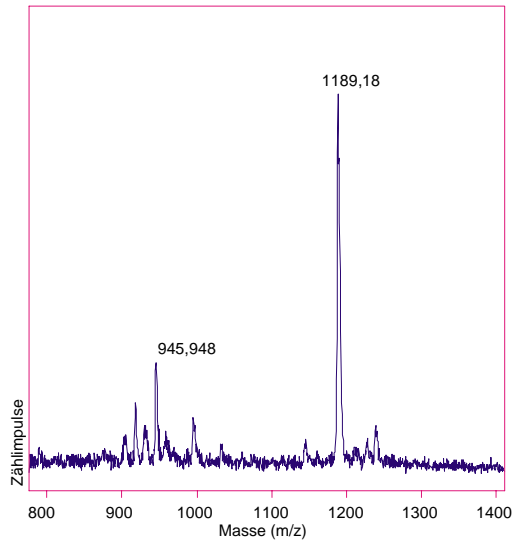
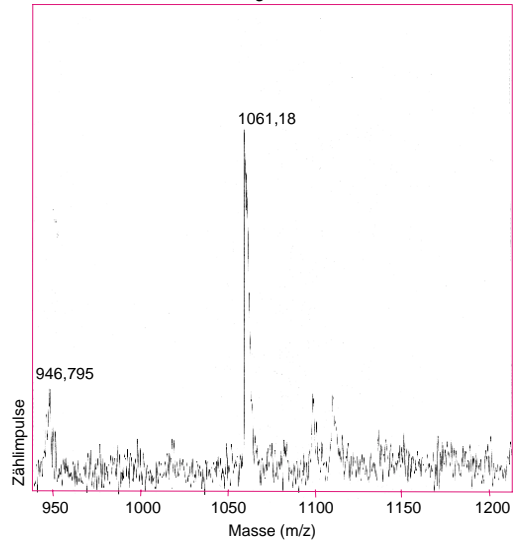


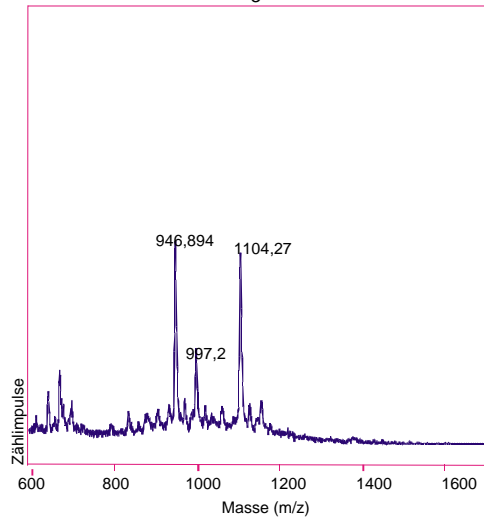
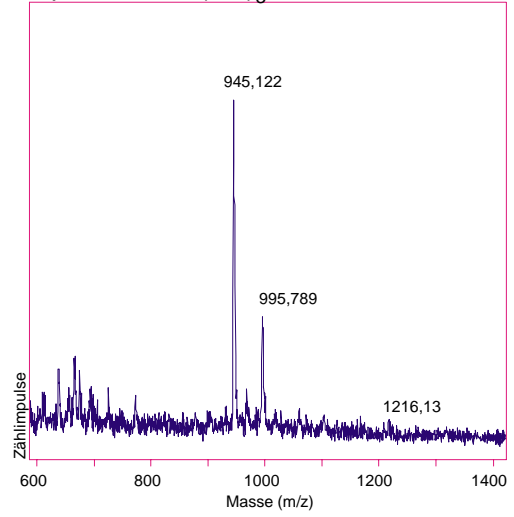
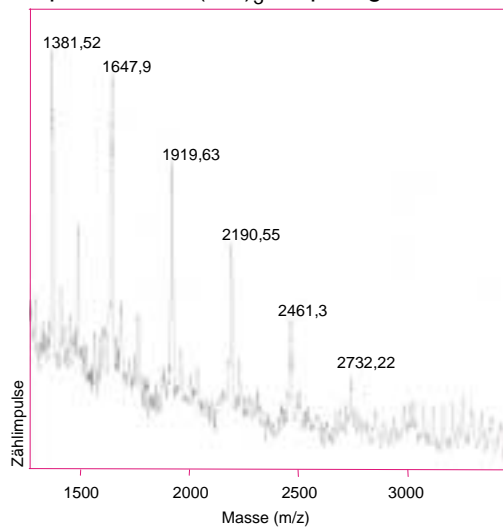
Spektrum 5: Edukt $(\text{DR})_3$



Spektrum 6: $(\text{DR})_3+\text{Asp}$



Spektrum 7: $(DR)_3$ -D+AspSpektrum 8: $(DR)_3$ -D+ArgSpektrum 9: $(DR)_3$ -D kein SubstratSpektrum 10: $(DR)_3$ +GluSpektrum 11: $(DR)_3$ -D-Lys+AspSpektrum 12: $(DR)_3$ -D+Orn

Spektrum 13: $(\text{DR})_3\text{-D+Cit}$ Spektrum 14: $(\text{DR})_3\text{-D-Cit+D}$ Spektrum 15: $(\text{DR})_3\text{+Asp+Arg}$ 

6.2.1. Erläuterung und Diskussion der MALDI-Massenspektren

6.2.1.1. Allgemeines

Die gemessenen Spektren zeigen immer die Massen von einfach positiv geladenen Molekülen. Prinzipiell kann diese Methode aufgrund unterschiedlichen Verhaltens bei der Bildung des aus Matrixsubstanz, Lösungsmittel und Probe bestehenden Mischkristalls sowie bei der Desorption und Ionisierung nur die Anwesenheit von Molekülen belegen. Ein Nichtauffinden eines Peaks beweist also nicht, dass kein Molekül dieser Masse Bestandteil der Probe ist, sondern kann auch andere Ursachen haben, wie z.B. physikalische Eigenschaften dieses Moleküls, die sich in unterschiedlicher Fähigkeit zu Desorption und Ionisation widerspiegeln können. Bedingt durch unterschiedliche Kalibrierungen variierten die detektierten Massen um maximal 3 Da. Innerhalb eines Spektrums war allerdings zu beobachten, dass die Abweichungen immer in etwa gleich waren und dass die Genauigkeiten unter Berücksichtigung dessen ca. 0,5 Da betrugen.

Wegen der mittels P2-Säule durchgeführten Entsalzung und Fraktionierung finden sich außerdem unterschiedliche Mengenverhältnisse der im Reaktionsansatz vorhandenen Moleküle in den gemessenen Proben wieder. Die Auswahl der Fraktion kann also auch das Spektrum beeinflussen. Als Matrixsubstanz wurde immer α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure verwendet, da diese die bei weitem höchste Zahl der Zählimpulse verursachte. Die Peaks mit einem m/z -Verhältnis zwischen 0 und 500 sind von der Matrixsubstanz verursacht. Häufig traten Peaks auf, die mit Na^+ - oder K^+ -assoziierten Molekülen erklärt werden können. Einige Peaks können nicht erklärt werden, so z.B. der häufig zu beobachtende Peak bei $m/z=M+50$.

6.2.1.2. Erläuterung der Spektren:

Spektrum 1:	Edukt $(\text{Ahx})_2\text{-(DR)}_3$
Spektrum 2:	Bildung eines Produktes mit der Molmasse entsprechend $(\text{Ahx})_2\text{-(DR)}_3\text{-D}$, sowie Na^+ -Peak ($M+23$)
Spektrum 3:	Edukt $(\text{DR})_3\text{-(Ahx)}_2$, sowie $M+50$ Peak und einer Verunreinigung aus der Synthese
Spektrum 4:	Keine Produktbildung, sowie Na^+ -Peak ($M+23$)
Spektrum 5:	Edukt $(\text{DR})_3$, sowie Matrixpeaks
Spektrum 6:	Bildung eines Produktes mit der Masse entsprechend $(\text{DR})_3\text{-D}$

- Spektrum 7: keine Produktbildung, M+50 Peak, unbekanntes Molekül mit der Molmasse 1018, keine Produktbildung gefunden
- Spektrum 8: Bildung eines Produktes mit der Masse entsprechend (DR)₄, M+50-Peak
- Spektrum 9: Keine Produktbildung ohne Aminosäuresubstrate, kein Abbau feststellbar, M+50-Peak
- Spektrum 10: Keine Produktbildung bei Inkubation mit Glutamat anstelle Aspartat
- Spektrum 11: Bildung eines Produktes entsprechend der Molmasse (DR)₃-(DK)-D, Peak bei m/z= 946 ist Verunreinigung des Eduktes mit dem Edukt der vorherigen Reaktion (DR)₃-D+Lys
- Spektrum 12: Einbau von Ornithin
- Spektrum 13: Einbau von Citrullin, sowie Edukt (DR)₃-D- und Edukt+50-Peak
- Spektrum 14: eine Verlängerung des Produktes aus 13 mit Aspartat konnte nicht nachgewiesen werden
- Spektrum 15: Bildung von kleinen Molekülen Cyanophycin, es konnte nur „stumpfes“ Cyanophycin gefunden werden. Die Abstände zwischen den einzelnen Produktpeaks sind jeweils m/z=271,3

6.3. Proteinsequenzvergleich

6.3.1. Proteinsequenzvergleich zwischen CphA aus *A. variabilis* und anderen Cyanobakterien

Charakteristische Motive sind überstrichen, die Lage der ortsspezifisch mutierten Aminosäuren sind mit "★" gekennzeichnet.

<i>A. variabilis</i>	1	-----	MRILKIQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	TLAETPSNEI	PGFYEGLVEA	50
<i>Anabaena</i> 7120	1	-----	MRILKIQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	TLAETPSNEI	PGFYEGLVEA	50
<i>N. punctiforme</i>	1	MVPNLHLP	MRILKIQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	TLAETPSNEI	PGFYEGLVEA	60
<i>Synechococcus</i> MA19	1	-----	MRILKIQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	NLAETPSNEI	PGFYEGLVEA	50
<i>Trichodesmium</i> IMS101	1	-----	MKILKLQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	DLYEKYTSDI	PGFYKGLTEV	50
<i>Synechocystis</i> 6803	1	-----	MKILKTLTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	DLAERPSNSI	PGFYEGLIRV	50
<i>Cyanothece</i>	1	-----	MKILKTLTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	DLADKPSNEI	PGFYDGLVEV	50
<i>Thermosyn. elong.</i>	1	-----	MKILKLQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	EVANTPSNQI	SGFVDGLVRV	50
<i>Synechocystis</i> 6308	1	-----	MKILKLQTLR	GPNYWSIRRH	KLIVMRDLDE	DVAEKPSNLI	PGFYEGLVKI	50

<i>A. variabilis</i>	51	LPSLEGHYCS	PGCHGGFLMR	VREGTMMGHI	VEHVALELQE	LAGMHVGFGR	TRETATPGIY	110
<i>Anabaena</i> 7120	51	LPSLEGHYCS	PGCHGGFLMR	VREGTMMGHI	VEHVALELQE	LAGMHVGFGR	TRETATPGIY	110
<i>N. punctiforme</i>	61	LPSLEGHYCS	PGCRGGFLMR	VKEGTMIGHI	VEHVALELQE	LAGMHVGFGR	TRETATPGIY	120
<i>Synechococcus</i> MA19	51	LPSLESHYCS	PGCRGGFLKR	VREGTMMGHI	VEHVALELQE	LAGMHVGFGR	TRQSTSPSVY	110
<i>Trichodesmium</i> IMS101	51	LPSLVEHLCS	PGVKGGFLTR	VEKGTILGHV	IEHVALELQE	LAGMPVGFGR	TRETSTTGVE	110
<i>Synechocystis</i> 6803	51	LPSLVEHFC	PGHRGGFLAR	VREGTYMGHI	VEHVALELQE	LVGMTAGFGR	TRETSTPGIY	110
<i>Cyanothece</i>	51	LPSLVEHYCS	PGHRGGFLER	VKEGTYMGHI	VEHVALELQE	LTKMPVGFGR	TRETATPGIY	110
<i>Thermosyn. elong.</i>	51	LPSLYNHFC	LGHEGGFLTR	LREGTYLGHV	VEHVALELQE	LAGMPVGFGR	TRETSTPGVY	110
<i>Synechocystis</i> 6308	51	LPSLVEHFC	RDRHGGFLER	VQEGTYMGHI	VEHVALELQE	LAGMPVGFGR	TRETSTPGIY	110

<i>A. variabilis</i>	111	QVVEYLNEE	AGRYAGRAAV	RLCQSIIDRG	RYPKAELEQD	IQDLKDLWRD	ASLGPSTEAI	170
<i>Anabaena</i> 7120	111	QVVEYLNEE	AGRYAGRAAV	RLCQSIIDRG	RYPKAELEQD	IQDLKDLWRD	ASLGPSTEAI	170
<i>N. punctiforme</i>	121	QVVEYLNEE	AGRYAGRAAV	RLCQSIIDRG	RYPKAELEQD	IQDLKDFTRD	ASLGPSTEAI	180
<i>Synechococcus</i> MA19	111	QVVEYLNEE	AGRYAGRAAV	RLCQSIIDRG	RYPKAELEQD	IQDLKDLWRD	AALGPSTESI	170
<i>Trichodesmium</i> IMS101	111	QVVEYENEE	AGRYAARAAS	RLCQSIIDTG	TYPATELQDD	LEDLKLKKNQ	ASLGPSTEAI	170
<i>Synechocystis</i> 6803	111	NVVEYVDEQ	AGRYAGRAAV	RLCRSLVDTG	DYSLTELEKD	LEDLRLDLAG	SALGPSTETI	170
<i>Cyanothece</i>	111	NVVEYVDEQ	AGRYAGRAAV	RLCRSLVDTG	TYPLKELEQD	LSDLQDLQAN	ASLGPSTQTL	170
<i>Thermosyn. elong.</i>	111	QVVEYQVEE	AGRYAGRAAV	RLCQSIIDTG	TYPQQLDQD	LADLRELKAK	ASLGPSTEAI	170
<i>Synechocystis</i> 6308	111	NVVEYVYEE	AGRYAGRAAV	RLCNSIITTG	AYGLDELAQD	LSDLKDLRAN	SALGPSTETI	170

<i>A. variabilis</i>	171	VKEAEKRGIP	WMQLSARFLI	QLGYGVNHKR	MQATMTDKTG	ILGVELACDK	EATKRILAAS	230
<i>Anabaena</i> 7120	171	VKEAEKRGIP	WMQLSARFLI	QLGYGVNHKR	MQATMTDKTG	ILGVELACDK	EATKRILAAS	230
<i>N. punctiforme</i>	181	IKAEAEKRGIP	WMPLSARFLI	QLGYGVNHKR	MQATMTDNTS	ILGVELACDK	EATKRILAAA	240
<i>Synechococcus</i> MA19	171	VKEAEKRGIP	WMQLSARFLI	QLGYGVNHKR	IQATMTDQTG	ILGVELACDK	EATKRILANA	230
<i>Trichodesmium</i> IMS101	171	VKEAEARGIP	WYQLSARFLI	QLGYGVNHKR	IQATLSNQTG	ILGVELACDK	EGTKRILKDA	230
<i>Synechocystis</i> 6803	171	VTEADARKIP	WMLLSARFAM	QLGYGVNHQR	IQATLSNSHG	ILGVELACDK	EGTKTILQDA	230
<i>Cyanothece</i>	171	VTEAEARNIP	WMLLSARFAM	QLGYGVNHQR	IQATLSNSYG	ILGVELACDK	EGTKTILQDA	230
<i>Thermosyn. elong.</i>	171	VTEAEARNIP	WMLLSARFAM	QLGYGVNHQR	MQATLSNDRS	ILGVELASDK	EGAKRLLQDA	230
<i>Synechocystis</i> 6308	171	IKAEAEKRGIP	WMLLSARFAM	QLGYGVNHQR	IQATLSNKTG	ILGVELACDK	EGTKTTLAEE	230

B-loop								
★-----								
<i>A. variabilis</i>	231	GVPVPRGTVI	NFLDDLEEAI	EYVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITIDIRSWEE	AEAAEYEAARQ	290
<i>Anabaena</i> 7120	231	GVPVPRGTVI	NFLDDLEEAI	EYVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITIDIRSWEE	AEAAEYEAARQ	290
<i>N. punctiforme</i>	241	GAPVPRGTVI	NFLDDLEQAI	EYVGGYPIVV	KPLDGNHGRG	ITIDIRTWEE	AEAAEYEAARQ	300
<i>Synechococcus</i> MA19	231	GIPVPKGTVI	NFLDDLEEAI	EYVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITINIQNWEE	AEAAEYDAARQ	290
<i>Trichodesmium</i> IMS101	231	GVPVPRGTVA	RYFDLQDAI	EYVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITIDVKNQWE	AEAAEYDLARK	290
<i>Synechocystis</i> 6803	231	GIPVPRGTII	QYFDLQDAI	NDVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITINVRHWEE	AEAAEYDLAAE	290
<i>Cyanothece</i>	231	GVPVPRGTII	QYFEELSAI	DDVGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITIDINSWKE	AEAAEYDLASE	290
<i>Thermosyn. elong.</i>	231	GIPVPKGTVI	RYIEDLPEAI	EEIGGYPIVI	KPLDGNHGRG	ITIDINSLEA	AEAAEYFIASS	290
<i>Synechocystis</i> 6308	231	GIPVPRGTVI	YYADELADAI	ADVGGYPIVL	KPLDGNHGRG	ITIDINSQWE	AEAAEYDLASA	290

★								
<i>A. variabilis</i>	291	VSR--SIIVE	RYVGRDHRV	LVVDGKVVAV	AERVPAHVIG	NGRSTIAELI	EEINQDPNRRG	348
<i>Anabaena</i> 7120	291	VSR--SIIVE	RYVGRDHRV	LVVDGKVVAV	AERVPAHVIG	NGRSTVAELI	EEINQDPNRRG	348
<i>N. punctiforme</i>	301	VSR--SIIVE	RYVGRDHRV	LVVNGKVVAV	AERVPAHVIG	NGRSTISELI	EETNLDPNRRG	358
<i>Synechococcus</i> MA19	291	ISR--SIIVE	RYVGRDHRV	LVVD--ASSAV	AERVPAHVIG	DGRSTIAELI	EETNKDPNRRG	347
<i>Trichodesmium</i> IMS101	291	ASKTKTVIVE	RYVTGKDRV	LVVNGKVVAV	AERVPAHVIG	NGKSTIAELI	EETNRDPQRRG	350
<i>Synechocystis</i> 6803	291	ESKRSIIVE	RYVEGSDHRV	LVVNGKLVAV	AERIPAHVTG	DGTSTITELI	DKTNQDPNRRG	350
<i>Cyanothece</i>	291	ESKTRTVIVE	RYVKGSDHRL	LVVNGKLVAV	AERVPAHVIG	DDKHTIEELI	DITNEDPRRG	350
<i>Thermosyn. elong.</i>	291	ISK--SVIVE	RYHAGDRFRV	LVVNGKVVAV	AERVPAHVIG	DGHSTIEELI	EKTNQDPQRRG	348
<i>Synechocystis</i> 6308	291	ASKTRSVIVE	RYVKGSDHRV	LVVNGKLVAV	SERIPAHVTG	NGSSTIEELI	QETNEHPDRG	350

										J-loop	
										★-----	
A.variabilis	349	DGHDKVLTKI	ELDRTSYQLL	ERAGYTLNSV	PPKGTICYLR	ATANLSTGGT	AVDRTDEIHP	408			
Anabaena 7120	349	DGHDKVLTKI	ELDRTSYQLL	ERAGYTLNSV	PPKGTICYLR	ATANLSTGGT	AVDRTDEIHP	408			
N.punctiforme	359	EGHDNVLTKE	ELDRTSYQLL	ERQGYTLNSV	PPKGTICYLR	ATANLSTGGS	AVDRTDEIHP	418			
Synechococcus MA19	348	EGHDNILTKE	ELDRTSYQLL	ERQGYTLDSI	LPQGEICYLR	ATANLSTGGI	AVDRTDEIHP	407			
Trichodesmium IMS101	351	DGHDNILTKE	TVDKSALDIL	GKQYSIDSI	PLKGGKCFLR	ATANLSTGGI	AVDRTDEIHP	410			
Synechocystis 6803	351	DGHANILTKE	VVNKTAIDVM	ERQGYNLDSV	LPKDEVVYLR	ATANLSTGGI	AIDRTDDIHP	410			
Cyanothece	351	EGHDNVLTKE	KVDKTVLGLM	DKQGLRLDSI	LDKGEIVYLR	ATANLSTGGS	AIDRTDDIHP	410			
Thermosyn.elong.	349	DGHDNILTKE	EVNHDWTWTL	EKQGYTLNTV	LQPGICYLR	ATANLSTGGI	AIDRTDEIHP	408			
Synechocystis 6308	351	DGHDNVLTKE	SIDRTSLGLV	KRQGFEMDTV	LKKGEVAYLR	ATANLSTGGI	AIDRTDEIHP	410			
A.variabilis	409	ENIWLARVVE	KIIGLDIAGL	DIVTTDISRP	LRELDGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGIPRN	468			
Anabaena 7120	409	ENVWLAQRVV	KIIGLDIAGL	DIVTTDISRP	LRELDGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGIPRN	468			
N.punctiforme	419	ENLWLAQRVV	KIIGLDIAGL	DIVTTDISRP	LREVDGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSVGIPRN	478			
Synechococcus MA19	408	ENVWLAQGVV	KIVGLDIAGI	DIVTPDISRP	LREVDGVVVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGTPRN	467			
Trichodesmium IMS101	411	ENVWLLSRVA	KIIGLDIAGI	DVVTEDISQP	LREVEGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSRGLARN	470			
Synechocystis 6803	411	ENIWLMEVRA	KVIGLDIAGI	DVVTSDISKP	LRENTGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGLPRN	470			
Cyanothece	411	ENLWMAERVA	KIIGLDIMGI	DVVTDPDITKP	LRDVDGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGLSRN	470			
Thermosyn.elong.	409	ENVWICQRAA	RIIGLDIAGI	DVVSPPDISQP	LSKVGGVIVE	VNAAPGFRMH	TNPSQGIARN	468			
Synechocystis 6308	411	QNIWIAERVA	KIIGLDIAGI	DVVTDPDITKP	LTEVDGVIVE	VNAAPGFRMH	VAPSQGLPRN	470			
										P-loop	
										---★---	
A.variabilis	469	VAGAVMDMLF	PNEQSGRIPI	LSVTGTNGKT	TTTLLLAHIY	KQTGKVVGYT	TTDGTIYIGDY	528			
Anabaena 7120	469	VAGAVMDMLF	PNEQSGRIPI	LSVTGTNGKT	TTTLLLAHIY	KQTGKVVGYT	TTDGTIYIGDY	528			
N.punctiforme	479	VAGAVMDMLF	PNEQSSQIPI	LSVTGTNGKT	TTTLLLAHIY	KQTGKVVGYT	TTDGTIYIGDY	538			
Synechococcus MA19	468	VAAAVLDMLE	PSEQSSRIPI	LSIIGTNGKT	TTTLLLAHIF	KQTGKVVGYT	TTDGTIYIGDF	527			
Trichodesmium IMS101	471	VAGAVMDMLF	PGSKNGRIPI	LSVTGTNGKT	TTTLLLAHII	KQTGKVVGYT	TTDGTIYIGEY	530			
Synechocystis 6803	471	VAAVLDMLF	PSGTSPRIPI	LAVTGTNGKT	TTTLLLAHIY	RQTGKTVGYT	STDATYINEY	530			
Cyanothece	471	VAAVMDMLF	PPESPSPVPI	VAITGTNGKT	TTTLLTAHIY	RQTGKVVGYT	STDGVYIGEY	530			
Thermosyn.elong.	469	VAEPLVNLMLF	PPGTPCRIPI	FAITGTNGKT	TTTLLIAHIC	KQTGQTVGYT	TTDGIYIGDY	528			
Synechocystis 6308	471	VAAVLDMLF	PDNHSPRIPI	LAVTGTNGKT	TTTLLLAHIY	RQTGKVVGYT	STDGIYIGDY	530			
A.variabilis	529	LVESGDNTGP	QSAHVILQDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLG	FESANVGTVL	NVAADHLGLG	588			
Anabaena 7120	529	LVESGDNTGP	QSAHVILQDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLG	FESANVGTVL	NVAADHLGLG	588			
N.punctiforme	539	LVEAGDNTGP	QSAHVILQDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLG	FEAANVGTVL	NVAADHLGLG	598			
Synechococcus MA19	528	LVEAGDNTGP	QSAQVILQDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLA	FHAANVGTVL	NVAADHLGLG	587			
Trichodesmium IMS101	531	LAETGDNTGP	QSAHLILSDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLG	FSSCEVGIVT	NVTADHLGLG	590			
Synechocystis 6803	531	CVEKGDNTGP	QSAAVILRDP	TVEVAVLETA	RGGILRAGLA	FDTCDVGTVL	NVAADHLGLG	590			
Cyanothece	531	LVEKGDNTGP	FSAGMILKDP	TVEVAVLESA	RGGILRSGLA	FDTCDVGIVL	NVAADHLGLG	590			
Thermosyn.elong.	529	LVEKGDNTGP	QSAQVILQDP	TVEVAVLETA	RGGILRSGLG	FDHCDVGTVL	NVAADHLGLG	588			
Synechocystis 6308	531	MVEKGDNTGP	VSAQVILRDP	TVEVAVLECA	RGGILRSGLA	FESCDVGTVL	NVAEDHLGLG	590			
A.variabilis	589	DIDTIDQLAN	LKSVAESVY	PDGYAVLNAD	DRRVAAMAEK	TKANIAYFTM	NPDSSELVRKH	648			
Anabaena 7120	589	DIDTIDQLAN	LKSVAESVY	PDGYAVLNAD	DRRVAAMAEK	TKANIAYFTM	NSESELVRKH	648			
N.punctiforme	599	DIDTIDQLAN	LKSVAEAEV	PDGYAVLNAD	DHRVAAMSEK	TKANIAYFTM	NPDSSELVRKH	658			
Synechococcus MA19	588	DIDTIDQLAH	LKSVAEAEV	PDGYAILNAD	DPRVAAMAEK	TKANVGYFTM	NPDSSELVRKH	647			
Trichodesmium IMS101	591	DIDTIEQLAK	LKSVAESVM	PKGYAVLNAE	DPLVAAMADR	VKGQVAYFSM	DPNNELLRLH	650			
Synechocystis 6803	591	DIDTIEQMAK	VKSVAIEVVD	PSGYAVLNAD	DPLVAAMADK	VKAKVAYFSM	NPDPNPVIONH	650			
Cyanothece	591	DINTIEQMAR	VKGVAEVEVH	ADGYAVLNAD	DPLVAAMAEQ	VKGKVAIFSM	NPDPNEIHHN	650			
Thermosyn.elong.	589	DIDTVEQLAD	LKAVVVEVSAW	PNGYAVLNAD	DPLVAAMARQ	VKAQVAYFSM	DPHNPIIRQH	648			
Synechocystis 6308	591	DIDTIEQMAK	VKGVAIESVN	ADGYAVLNAD	DPLVAQMAKN	VKGKIAIFSM	SKDNPIIIDH	650			
A.variabilis	649	IQKGGVAAVY	ENGYLSIVKG	DWTHRIERAE	QIPLTMGGRA	PFMIANALAA	SLAAFVQNV	708			
Anabaena 7120	649	IQKGGVAAVY	ENGYLSIVKG	DWTHRIERAE	QIPLTMGGRA	PFMIANALAA	SLAAFVQNV	708			
N.punctiforme	659	IQKGGVAAVY	ESGYLSIVKG	DWTHRIERAE	NIPLTMGGRA	PFMIANALAA	SLAAFVQNV	718			
Synechococcus MA19	648	IQKGGVAAVY	ENGYLSIVKG	DWTHRIERAE	NIPLTMGGRA	PFMIANALAA	SLAAFVQNV	707			
Trichodesmium IMS101	651	TEAGGLAAVY	ENGYLSIVKG	DWTLRIEKAV	NVPITMAGKA	PFMIANALAA	CLAVTQGVK	710			
Synechocystis 6803	651	TRRNGIAAVY	ESGYVSILEG	SWTLRVEEAT	LIPMTMGGMA	PFMIANALAA	CLAAFVNGLD	710			
Cyanothece	651	TRRDGMAAVY	ENGYVSILEG	QFTLRRIEAV	NVPMTMGGMA	PFMIANALAA	CLAAFQGVG	710			
Thermosyn.elong.	649	IQQGGVAAVY	ENGYLSIVKG	DWTLRIEQA	NVPITLGA	PFMIANALAA	SLAAFQGV	708			
Synechocystis 6308	651	LRRNGMAAVY	ENGYLSIFEG	EWTLRIEKAE	NIPTVTKAMA	PFMIANALAA	SLAAFVHGID	710			

<i>A. variabilis</i>	709	IEQIRAGLRT	FRASVSQTPG	RMNLFNLGNY	HALVDYAHNP	ASYEAVGAFV	RNWTSGQRIG	768
<i>Anabaena</i> 7120	709	IEQIRAGLRT	FRASVSQTPG	RMNLFNLGNY	HALVDYAHNP	ASYEAVGAFV	RNWTSGQRIG	768
<i>N. punctiforme</i>	719	IEQIRSGLKT	FRASVSQTPG	RMNLFNLGNY	HALVDYAHNA	ASYEAVGSFV	RNWTGQRIG	778
<i>Synechococcus</i> MA19	708	IEQIRAGLST	FRASFSQTPG	RMNLFNLGSF	HALVDYAHNP	HSYEALGCFV	RSWTNGKRIG	767
<i>Trichodesmium</i> IMS101	711	IEHIRKGLST	FVASVDQTPG	RMNMFNMGSY	HALVDYAHNP	ASYEALGGFV	RNWP-GKRIG	769
<i>Synechocystis</i> 6803	711	VEVIRQGVRT	FTTSAEQTPG	RMNLFNLGRY	HALVDYAHNP	AGYRAVGDFV	KNWH-GQRFQ	769
<i>Cyanothece</i>	711	IEDIRQGVRT	FKASANQTPG	RMNLFNLGDY	HALVDYAHNP	AGYEAVGEFV	KNWK-GQRLG	769
<i>Thermosyn. elong.</i>	709	IEHIRAALT	FRTSVEQTPG	RMNLFDLGQF	SVLVDYAHNP	AGYEAIGEFV	QKWP-GQRIG	767
<i>Synechocystis</i> 6308	711	IELIRQGVRS	FNPGANQTPG	RMNLFDMKDF	SVLIDYAHNP	AGYLAVGSFV	KNWK-GDRLG	769
<i>A. variabilis</i>	769	VVGPGDRRD	EDFVTLGKLA	AEIFDYIIVK	EDDDTRGRPR	GSASALITKG	ITQVK-----	823
<i>Anabaena</i> 7120	769	VVGPGDRRD	EDFVTLGKLA	AEIFDYIIVK	EDDDTRGRPR	GSASELITKG	ITQVK-----	823
<i>N. punctiforme</i>	779	VVGPGDRRD	EDFVTLGKLA	AQIFDYIIVK	EDDDTRGRRL	GSAAQLIIQG	ITQVK-----	833
<i>Synechococcus</i> MA19	768	VVGPGDRRD	QDFITLGKLA	AEIFDYAIVK	EDDDTRGRTR	GSAADLIIRG	IKQVN-----	822
<i>Trichodesmium</i> IMS101	770	VVGPGDRRD	EDFVSLGELA	ADIFDEI I I K	EDDDTRGRPR	GNAELICQG	VKQFLNGIKN	829
<i>Synechocystis</i> 6803	770	VVGPGDRRD	SDLIELGQIA	AQVFDR I I V K	EDDDKRGRSG	GETADLIVKG	ILQEN-----	824
<i>Cyanothece</i>	770	VVGPGDRRD	EDLILLGKIA	ARVFDRI L V K	EDDDKRGRAR	GEAADLIIDG	ILSEN-----	824
<i>Thermosyn. elong.</i>	768	VVGPGDRRD	QDLEQLGELS	AKIFDWI I I K	EDDDTRGRPR	GDAAYWIERG	VHHHS-----	822
<i>Synechocystis</i> 6308	770	VVGPGDRRD	EDLMLLGKIA	SQIFDHI I I K	EDDDNRGRDR	GTVADLIAGK	IVAEN-----	824
<i>A. variabilis</i>	823	--PDARYESI	LDETQAINKG	LDMAPANGLV	VILPESVSRA	IKLIKLRGLV	KEEIQQQNPS	881
<i>Anabaena</i> 7120	823	--PDARYESI	LDETQAINKG	LDMAPANGLV	VILPESVSRA	IKLIKLRGLV	KEEIQQQNSS	881
<i>N. punctiforme</i>	833	--PDSRYESI	LDETQAINKG	LDMAPDNSLV	VILPESVTRA	IKLIKLRGLA	KEETHQONTG	891
<i>Synechococcus</i> MA19	822	--PKYKYESI	LDETQAINKA	LDIAPENSLV	VILPESVSRA	IQLIKARGVV	KEEITQQNSA	880
<i>Trichodesmium</i> IMS101	830	SESKATYESI	LDETA AINTA	LDRAPIDGLV	VILPESVNRA	ISLIEGRHVI	QDIELLODSQ	889
<i>Synechocystis</i> 6803	824	--PGAAYEVI	LDETVALNKA	LQVVEEKGLV	VVPESVSKA	IELIKARKPI	G-----	873
<i>Cyanothece</i>	824	--DKADYEAI	LDETEAIEYG	LDKVDKGGLV	VIFPESVTRA	ISLINRRNPI	-----	872
<i>Thermosyn. elong.</i>	822	--VQRQYDII	HDEVA A IQFA	LDRAPKGS LV	VIFPAEVSRT	IQLIRQHHQR	LQGETINGFH	880
<i>Synechocystis</i> 6308	824	--PNASYDDI	LDETEA I ETG	LKKVDKGGLV	VIFPESVTGS	IEMIEKYHLS	SE-----	874
<i>A. variabilis</i>	882	TTVIDNQNGV	ASSSVINTLL	---	901			
<i>Anabaena</i> 7120	882	TTVIDNQNGV	ASSSVINTLL	---	901			
<i>N. punctiforme</i>	892	TAIADSQNGI	APSSVNTLL	---	911			
<i>Synechococcus</i> MA19	881	STTTDSQVGA	TSSNVNTVN	TIL	903			
<i>Trichodesmium</i> IMS101	890	REPKDQE--V	LKSSI-----	---	902			
<i>Synechocystis</i> 6803	873	-----	-----	---	873			
<i>Cyanothece</i>	872	-----	-----	---	872			
<i>Thermosyn. elong.</i>	881	SEGRPTSGDL	NPSIFH----	---	896			
<i>Synechocystis</i> 6308	874	-----	-----	---	874			

Sequenzvergleich wurde erzeugt mit:

BioEdit version 5.0, BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright© 1997-2001 Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University,
Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Die dunkelgrau hinterlegten Positionen bezeichnen Sequenzidentitäten, die hellgrau hinterlegten Flächen stehen für ähnliche Aminosäuren. Ähnlichkeitsdefinition BLOSUM62 wurde aus oben genanntem Programm übernommen.

Originalquelle der Matrix: <ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/blocks/unix/blosum/BLOSUM/blosum62.bla>

Originalzitat: Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89 (22); 10915-10919.

6.3.2. Proteinsequenzvergleich zwischen CphA aus *A. variabilis* und ähnlichen Sequenzen aus nichtcyanobakteriellen Bakterien

Charakteristische Motive sind überstrichen, die Lage der ortsspezifisch mutierten Aminosäuren sind mit "★" gekennzeichnet.

<i>A. variabilis</i>	1	-----	-----	MRI	LKIQTILRGPN	YWSIRRHKLI	VMRLDLETLA	ETPSNEIP-G	42
<i>Acinetobacter</i>	1	-----	-----	MNI	ISTSVYVGP	VYASI--PLI	RLVIDLNPHY	ITQLASMGSE	41
<i>D. hafniense</i>	1	-----	-----	MEI	LKIQAIPGAN	VYSYR--PVI	RAVVDLQEW	ERTSDTFG-D	40
<i>C. botulinum</i>	1	-----	-----	MKI	ENIRVFEGRN	IYSHK--KCI	RMDVDLEGYS	NISSKEIQ-E	40
<i>C. perfringens</i>	1	-----	-----	MKI	NNQRIFEGRN	IYSHR--KCI	RLDVDLEGYC	ETPTKIDID-G	40
<i>B. paraptussis</i>	1	MPRRPNGGAS	STTGIPAMEV		SRIRALRGPN	LWSRN--TAI	EAIAACSD-A	ECAINGMP-D	56
<i>N. europaea</i>	1	-----	-----	MKV	LQIRALRGPN	VWSKL--AAI	EATLVFEQ-N	ECLPDSIP-G	39
<i>T. tengcongensis</i>	1	-----	-----	MKI	KEIRVYGRN	VYSHR--PVI	KMTVDI-EGE	EIPTKDIP-G	39
<i>C. thermocellum</i>	1	-----	-----	MRI	QSIQCFAGRN	IYSHK--PVV	KVTLDIGELY	KLPTKDLG-D	40
<i>A. variabilis</i>	43	FYEGLVEALP	SLEGHYCSPG	CHGGFLMRVR	EGTMMGHIVE	HVALELQELA	GMHVGFGRTR		102
<i>Acinetobacter</i>	42	VLENLEKVIP	TLKTEQDAKL	QHKLELRQA	PQQQIGELVA	ILALHLQRLA	GQKGAFAFSA		101
<i>D. hafniense</i>	41	FNTRLVQCLP	SLYEHFCSRG	KPGGFVERLK	EGTLVGHIII	HVTIELLTRA	GQNPYQKTL		100
<i>C. botulinum</i>	41	FNKTLNLYVP	ELREHCCCVG	KKGGFVERLY	EGTYLSHICE	HVITIALQNR	GIDVSYGKAR		100
<i>C. perfringens</i>	41	FNERLLSYVP	ELYTHRCGID	IEGGFVQRLK	EGTYLAHVCE	HTIIGIHNKL	GIDIKYGKAR		100
<i>B. paraptussis</i>	57	FEARLRARFP	QLGVLQPE--	-----GQR	DAISMAHVLO	ATALGLQAHA	GCPVTFGRTS		107
<i>N. europaea</i>	40	FDTRLREYFP	DIALLOP---	-----VDW	QETTLAHLA	FITLKLQERA	GCSVSFSRVI		89
<i>T. tengcongensis</i>	40	FNETLLNLLP	GLKKHTCSYG	YEGGFAKRL	EGTYLPHVTE	HIILELQNVL	GYDVKFGRAR		99
<i>C. thermocellum</i>	41	FNERLLALFP	GLKKHYCSLG	YEGGFEEERLK	EGTYIGHVTE	HLIIELONIL	GVEVNYGKTR		100
<i>A. variabilis</i>	103	ETATP-GIYQ	VVIEYLNEEA	GRYAGRAAVR	LCQSIIVDRGR	Y-PKAELEQD	IQDLKDLWRD		160
<i>Acinetobacter</i>	102	YCHE--DETE	ILYSYSEEEI	GIEAGEVVC	MLVALAKAHE	AGDQIDLNRD	VKGFLRYADR		159
<i>D. hafniense</i>	101	CLPEHPGHYE	IIFNYDSLEG	GLEGFGQGYA	LVQELLAG--	--QKPNVTNR	IERIREVIQR		156
<i>C. botulinum</i>	101	ELBG--EKYY	IIFYQYKYNM	AIECGKIAVD	LINNIING--	--KRYNIKTK	TRELVCLLKT		154
<i>C. perfringens</i>	101	EIKD--DFYY	IIFYEYKLKRT	AILIAELAI	LINSIIKK--	--KDINFDER	IEIINRVIME		154
<i>B. paraptussis</i>	108	PTIEP-GVFQ	VVVEYSEEDV	GRLAFELAEA	LIRSAQDD--	--TPFDLPQA	LQRLRLDLED		162
<i>N. europaea</i>	90	KMAEA-NTWR	VVVEYSEEA	GRLALEQSLA	LCRAVAEA--	--APFDTSEA	VNRLRELYED		144
<i>T. tengcongensis</i>	100	NVEG--SLYN	VIFEYSLEEC	GIRAAKLAVD	LVNKLIRG--	--EKIDLEEK	LEKISNIIAE		153
<i>C. thermocellum</i>	101	IVVEP-SLYF	IVFEYKNEKC	AIECARAAVN	IVLKLVRN--	--EEVDTEAI	INNLRRAIAVE		155
<i>A. variabilis</i>	161	ASLGPSTEAI	VKEAEKRGIP	WMQLSARFLI	QLGYGVNHKR	MQATMTDKTG	ILGVELACDK		220
<i>Acinetobacter</i>	160	FALGPSALAL	VQAAEERNIP	WYRLNDASLI	QVGQGYQKR	IEAALTSGTS	HIAVEIAGDK		219
<i>D. hafniense</i>	157	GLTKKLLYEG	IEAAEGRGIP	VIRLNDSSLL	QLGYGRNQKR	VQAAMSDQTS	CIGVDIACDK		216
<i>C. botulinum</i>	155	EELGPSTLSI	IQEAKKRNI	VTKIGEDSMF	QLGYGIKGT	IEATICNSTS	AVSVDIACDK		214
<i>C. perfringens</i>	155	ESIGPSTKAI	CDAAKEVGIP	IITVGNENLY	QIGYGKAGKR	FSATIGNNTK	GIAIDIAADK		214
<i>B. paraptussis</i>	163	TRLGPSTGSI	VNAAVARSIP	YHRLTQGS	QFGWGSQRR	IQAAETDMTS	AISESIAQDK		222
<i>N. europaea</i>	145	IRLGPSTNSI	VQAAVRRKIP	YHRLTQGS	QFGWGSQRR	ILASEDLTS	VVAESTIVQDK		204
<i>T. tengcongensis</i>	154	VELGPSTMAI	KMEALKRGIP	VTRVNGSIL	RLGYGKYQKI	IEGTISQNTS	CLAVDIASDK		213
<i>C. thermocellum</i>	156	TDMGPSTKAI	YEEAKRGIP	VTRIGDGSVL	RLGYGKYSRI	VQASLTDFPS	CINVDMAGNK		215
B-loop									
★-----									
<i>A. variabilis</i>	221	EATKRILAAS	GVPVPRQTVI	NFLDDLEEAI	EYVGYPYIVI	KPLDGNHGRG	ITIDIRSWEE		280
<i>Acinetobacter</i>	220	NVCNQLLQDL	GLPVPKQRVV	YDIDDAVRAA	RRVG-FPVVL	KPLDGNHGRG	VSVNLTTDEA		278
<i>D. hafniense</i>	217	GLTKKLLYEG	GIPVPDQVVT	RNEDEAVEVF	RQLD-RLVVV	KPYNGNQGKG	VTLKLGTAE		275
<i>C. botulinum</i>	215	LKSKNIMDQ	CIPVAEGYKV	KNYIDLLFKA	EKLG-YPVVL	KPRFGNQGKG	VVVKINQKE		273
<i>C. perfringens</i>	215	MLTKELLDIQ	NLPVARGKEV	FNTIHLIEAV	NRIG-YPVVL	KPQWGSKGNG	VFVNINSEKE		273
<i>B. paraptussis</i>	223	DLTKMLLDAA	GVPVPMGSSV	DSAAAQWQAA	QALS-GPVVV	KPRDGSQGRG	VAVNIETDRD		281
<i>N. europaea</i>	205	DLTKMLLHTA	GIPVPTGRPV	ISADDAWAAA	CEIG-APIVI	KPQDGNQGKG	VTANLTDRLDQ		263
<i>T. tengcongensis</i>	214	ILTKKILKDH	GLPVPEGDVA	YNEEEAISIA	EELG-YPVVI	KPYNGNQGKG	VHLNISNREE		272
<i>C. thermocellum</i>	216	QLAKRLLAEN	KIPVPDQDTA	YSFEGALQIA	REIG-FPVVI	KPVDNQGKG	VTLNIKDEQE		274
★									
<i>A. variabilis</i>	281	AEAAEAAARQ	VSRSIIVERY	YVGRDHRVLV	VDGKVVAVAE	RVAHVIGNG	RSTIAELIEE		340
<i>Acinetobacter</i>	279	VEAAFDIAMS	EGSAVIVESM	LYGDHRLLLV	VNGELVAAAR	RVPGHVIGDG	KHNVEALIEI		338
<i>D. hafniense</i>	276	VRAAFRVAQT	YEEQVVVEEY	IEGKNYRLLV	VDGKMAAAAE	RIPAHVIGDG	VSTVGLVQL		335
<i>C. botulinum</i>	274	LVNAYSIVNK	KFQDIMIEKY	INGKDYRACV	VDGKVVAVAQ	RIPPYIIGNG	KSTIYELIKE		333
<i>C. perfringens</i>	274	LLRAYAEITK	ECKEIMIEEY	KVGNDYRVM	VDYKVVAVSL	RKPPYITGDG	VRNIRDLIEA		333
<i>B. paraptussis</i>	282	IESAFEAAAE	ISSEVIVERY	IPGHDFRLLV	VGNLTVAAAR	RDPPQVTGDG	THIAELVAQ		341
<i>N. europaea</i>	264	IKAAHYHVAE	RSRNVLVERY	ISGHDYRLLV	VGNKLVAAAR	RDPPQVVGDG	IHSIAQLVKQ		323
<i>T. tengcongensis</i>	273	VVIAYRNAKN	YSDLMVMEKQ	IRGRHYRVLV	VGEKVVAVAE	RIPAHVIGDG	VHTVKELIEI		332
<i>C. thermocellum</i>	275	MEIAYNEARK	YSRVVLVEKY	VKGKDYRVLV	VGDRVAAVAE	RRPFFVIGDG	VHTVEELVAI		334

						J-loop ★-----	
<i>A. variabilis</i>	341	INQDPNRGDG	HDKVLTKIEL	DRTSYQLLER	AGYTLNSVPP	KGTICYLRAT	ANLSTGGTAV 400
<i>Acinetobacter</i>	339	VNQDPRRGVG	HENMLTKIEL	DEQALKLAE	KGYDKDSIPA	KDEVVYLRR	ANISTGGTAI 398
<i>D. hafniense</i>	336	ANSDFQRGED	HEKALTKIKI	DPVVLMTLTQ	KKIALETVPA	DGEVVYLRDS	ANLSTGGISV 395
<i>C. botulinum</i>	334	LNRDERRGDG	HEKPLTKVKI	DKDLKNNINK	EGYTLGYILP	EYKLELRHN	ANLSTGGVAI 393
<i>C. perfringens</i>	334	MNANPLRGEG	HEKPLTKVKI	DEELINRLSK	LGYSLNSVLE	YGEKVTLRGN	ANLSTGGSAE 393
<i>B. parapertussis</i>	342	VNADPLRGDG	HATSLTKIRF	DDIAIATLRK	QGYEADSVAA	AGALVVLRRN	ANLSTGGAAT 401
<i>N. europaea</i>	324	INSNPLRSEG	HANLLTRIHL	DEISLAHLAL	QGLNAASVPD	KGKLVTLRRN	ANLSTGGTAT 383
<i>T. tengcongensis</i>	333	ENKNPLRGNG	HEKPLTKITV	DAVSKMVLQK	QGLTLDVPR	KGRKVFLRES	ANLSTGGIAI 392
<i>C. thermocellum</i>	335	ENLSSLRGDD	HEKPLTKIKL	DATALKVLKD	QGIGKDHVPS	LGERIYLRYN	GNLSTGGTAR 394

<i>A. variabilis</i>	401	DRTDEIHPE	IWLAQRVVKI	IGLDIAGLDI	VTTDISRPLR	ELDGVIVEVN	AAPGFRMHVA 460
<i>Acinetobacter</i>	399	DVTDTIHPE	KLMAERAIRA	VGLDIGAVDF	LTTDITKSYR	DIGGGICEVN	AGPGLRMHIS 458
<i>D. hafniense</i>	396	DVTERVHPDN	AALAEYAARI	VGLDIAGVDM	VLEDIERPHQ	EORGAIIEVN	AAPGLRMHQA 455
<i>C. botulinum</i>	394	DCTDLICTET	REVCERAAKA	IGLNICGIDI	CCSDISKPLK	ENEG-IMEVN	AAPGIRMHQA 452
<i>C. perfringens</i>	394	DYTDLICKEN	IEICERAAKT	IGLDICGIDI	CAKSIAEPLY	ENDGIILEVN	AAPGIRMHHF 453
<i>B. parapertussis</i>	402	DVTDEVHPEL	AARAVTAARM	IGLDICGVDP	VAETVHLPLE	DQHGQVVEVN	AAPGLRMHLN 461
<i>N. europaea</i>	384	DVTDEVHPDI	AECAVMAARM	TGIDICGIDV	ICSSLSRPLG	EQGGAVIEVN	AAPGLRMHLQ 443
<i>T. tengcongensis</i>	393	DRTDEIHPHN	IEIAVRAAKA	IGLDIAGIDI	TMEDIRKPLS	ATNGAIIEIN	ASPGIRMHHY 452
<i>C. thermocellum</i>	395	ECTDEIHFPN	ADIAVKAQI	IGLDIAGVDI	TTEDISVPIS	ENGGAIEIN	AAPGLRMHLF 454

P-loop

---★---

<i>A. variabilis</i>	461	PSQGIPRNVA	GAVMDMLFPN	EQSGRIPILS	VTGTNGKTTT	TRLIAHIYKQ	TGKVVGYYTTT 520
<i>Acinetobacter</i>	459	PSEGPSRDVG	GKIMDMLFPQ	GSQSRVPIAA	ITGTNGKTTT	SRMLAHILKM	AGHVVGQTST 518
<i>D. hafniense</i>	456	PTVGRPLDVG	KIIVDHVPK	GNGR-IPVIS	VTGTNGKTTT	TRMIGKMLTD	RELAVGMTTT 514
<i>C. botulinum</i>	453	PYKGKSRNVA	KAIVDMFKE	YDGN-IPVIS	ITGTNGKTTT	TRLIAHILSF	SGKKVGMTTT 511
<i>C. perfringens</i>	454	PTIGKERNVG	RKILDNMFEK	NYSN-IPVIS	VTGTNGKTTT	VRLISYVLNL	IGFNVGCTTT 512
<i>B. parapertussis</i>	462	PSFGKGRAVG	EAIISHMAFE	RDDGRIPVVA	VAGTNGKTTT	VRLTAHILDC	AGHRVGMTNS 521
<i>N. europaea</i>	444	PSYGKPRAVG	EAIIDHLEAP	GENARIPVIA	VTGTNGKTTT	VRLIANMLEN	NRLRVGIACI 503
<i>T. tengcongensis</i>	453	PSKGKPRNVA	KAIVDMLEFPK	GSKATIPIVS	ITGTNGKTTT	TRMVAHILKT	YGYTVGMTTT 512
<i>C. thermocellum</i>	455	PSEGKTRNVA	ADILDMLEFE	ASPHSIPIVS	VTGTNGKTTT	TRLIGHTLAC	LGKKVGMTST 514

<i>A. variabilis</i>	521	DGTIYG DYLV	ESGDNTGPQS	AHVILQDPTV	EVAVLETARG	GILRSGLGFE	SANVGVLNV 580
<i>Acinetobacter</i>	519	DAVYIDGNVT	VKGDMTGPVS	AKMVLDPSPV	DIAVLETARG	GIVRSGLGVQ	FCDVGAVLNV 578
<i>D. hafniense</i>	515	DGIYVGKLL	LKGDTTGPES	AQIVLRHPDV	QVAVLETARG	GILRAGLAYD	YADVAVVTNV 574
<i>C. botulinum</i>	512	GGIYINNKCI	NKGDTTGYS	AKTVLTNKEA	EVAVLELARG	GLIRDGLPYD	LADVGIITNV 571
<i>C. perfringens</i>	513	SGVKIGNRYI	HKGDDTGYS	ARSVLNPEV	DIAVLESARG	GLVRRGLAYD	LADVGVITNI 572
<i>B. parapertussis</i>	522	DGVYVGKQRI	DTGDCSGPRS	ARRLLHPDV	DAAVLETARG	GVLREGLAFD	RCNVAIVTNI 581
<i>N. europaea</i>	504	DGVFVNGQCV	DTGDCSGPQS	ARNILFHEV	DAAVLETARG	GILREGLGFD	YCDVAVVTNI 563
<i>T. tengcongensis</i>	513	DGIYIDDKCI	YKGDNTGPKS	ARTCLADKNI	DAAVLETARG	GILREGLGYD	LADVGVITNI 572
<i>C. thermocellum</i>	515	GGIFIGDECV	LKGDNTGPTS	AAMVLSSEV	EVAVLETARG	GIVRKGLGYD	LADVGVITNI 574

<i>A. variabilis</i>	581	A-ADHLGIDG	IDTIDQLANL	KSVVAESVYP	D-GYAVLNAD	DRRVAAMAEK	TKAN-LAYFT 637
<i>Acinetobacter</i>	579	S-SDHLGLGG	VDTLDGIAEV	KRVIAEVTKD	T---VVLNAD	NAYTLKMAGH	SPAKHIMYVT 634
<i>D. hafniense</i>	575	A-NDHLGQYG	MESLEDIAHV	KSLIAEVVPR	H-SYVVLNAD	DPLVASFARK	TKGK-VIFFS 631
<i>C. botulinum</i>	572	T-EDHLGLGG	INTLEDMAVY	KALVGEAIKK	D-GYVINAD	DEASISIINR	MKSK-IILFT 628
<i>C. perfringens</i>	573	R-EDHLGIDG	INDMEDLSFV	KSLVGEAVKD	N-GYSVINAD	DEWSLKVLDL	IKKP-KILFS 629
<i>B. parapertussis</i>	582	GMGDHLGLGY	ISTVEDLAVV	KRVIVQYVQP	D-GMAVLNAA	DPMVAEMASA	CPGS-ITYFA 639
<i>N. europaea</i>	564	GRGDHLGLAN	INTAEELAAV	KRTIVENVNP	KTGVAVLNAD	DPLVLGMASH	CPGN-VTFFS 622
<i>T. tengcongensis</i>	573	S-EDHLGIDG	INTLEDLAFV	KALVVEAVKD	D-GYSVLNAD	DPMPYLAKE	AKGK-ITYFS 629
<i>C. thermocellum</i>	575	A-EDHLGIDG	MNTLEDLAFV	KSLVVEAVKE	G-GYSVLNAD	DKFVRYFMER	AKGE-IILFS 631

<i>A. variabilis</i>	638	MNPDSSELVRK	HIQKGVAAV	YEN----GYL	SIVKQDWTHR	IERAEQIPLT	MGGRAFPMIA 693
<i>Acinetobacter</i>	635	RDAENKLVRE	HIRLGKRAVV	LEKGLNGDQI	VIIYENGTOIP	LIWTHLIPAT	LEGKAIHNVE 694
<i>D. hafniense</i>	632	TEKDNLTIRK	HLAVGGIAVF	VRR----GNI	LLCQGDQSHK	ICGVKDLPTV	WNGKALHNLQ 687
<i>C. botulinum</i>	629	KNKNNPIISQ	YLDNKNLVLY	LDE----DTI	YLKKNLKNKEE	IINVNKIPIT	LGGKLIYNVE 684
<i>C. perfringens</i>	630	MNENNKYLQE	NLKLGNPIVF	YRD----ETI	YVKNRGKEYK	IASAEEMKFT	MNGKLKHNI 685
<i>B. parapertussis</i>	640	EDRNHPVMAT	HRAQGHVVY	RDG----DSL	VAAQGGAEVA	FA-LADIPLT	RGGAIAFQVE 694
<i>N. europaea</i>	623	RNHRHPVILE	QRVQGRVIY	MED----HHI	IVAEAGTERR	IS-LSQIRLT	KNGMISFQID 677
<i>T. tengcongensis</i>	630	MYDNNTLVKR	HIENGGLAVY	VKE----GVI	VIANQIIVPV	VR-IEEIPAT	LGGKVLHNI 684
<i>C. thermocellum</i>	632	KNNSNPVVKE	HMQKGGKALY	VDK----DSI	FIYNGKTAEV	LMSVKEIPIT	YGMIECNIE 687

A. variabilis	694	NALAA	SLAAF	VQNV	SIEQIR	AGLR	TFRASV	SQTP	GRMNL	NLGN	YHALVD	YAHN	PASYEA	753	
Acinetobacter	695	NAMFA	AGMAY	ALGN	LDQIR	IGLR	TFDNTF	FQSP	GRMNV	DKHG	FRVILD	YGHNE	AAVGA	754	
D. hafniense	688	NALAA	IAVGW	SLGL	KAEGIR	TSLS	EFTSDP	ECNR	GRLNPF	TIGGV	QVVFID	YGHNA	AAGIKA	747	
C. botulinum	685	NAMAA	IAALI	ALGI	DVNTIR	QGLES	SFS-NE	EQNP	GRFNMY	NVHG	TNVILD	YGHNI	EGYKV	743	
C. perfringens	686	NAMAA	CAALV	GIEVD	YCIIS	KGLK	QFKSCE	EDNR	GRFNM	DVNG	INVILD	YAHNI	DGYKV	745	
B. parapertussis	695	NTMAA	LAAAW	ALGI	DWDTIR	HALAI	FVNDIA	QTAP	GRFNVF	DFRG	ATLIAD	YGHNP	DAIOA	754	
N. europaea	678	NAMAS	IGAGL	AIELD	WTITC	AGLAD	FVSDA	QTVP	GRFNLF	NYRE	ATLIAD	YGHNP	DAMEA	737	
T. tengcongensis	685	NSLAA	IAASY	GVKVP	INIIA	KGIKT	FYPDT	THNP	GRFNLF	NIGSF	RVLVLD	YGHNV	EGIKK	744	
C. thermocellum	688	NSLAA	ASALY	GLNLS	IEAIR	KGLAT	FNPDM	ESNP	GRFNIV	DMGDF	KVMLD	YGHNP	PAGYLE	747	
A. variabilis	754	VGAF	VRNWT	S	G-QR	IGVVG	PGDR	REDFV	TLGK	LAAEIF	DYII	VKEDDD	TRGR	PRGSAS	812
Acinetobacter	755	MTEL	VDRLNP	P	RGR	LLGVTC	PGDR	REDVV	AIAA	KVAGHF	DEYY	CHRDDD	LRGR	APDETP	814
D. hafniense	748	IAQT	LRKFK	A	P-AV	VCVTV	PGDR	PDETIR	EVAR	VAARGF	HRLI	IREDGD	LRGR	RPGEIA	806
C. botulinum	744	VLES	IKKIKH	K	-RIIG	VVG	PGDR	TNSSTL	KVGN	ICGENF	DYVY	IKEDRD	KRGR	KHGEIA	802
C. perfringens	746	VIDS	LKNLGL	L	K-NIT	GIIGV	PGDR	DLNTMK	EVGR	ISGDF	DSIV	IKEDKD	LRGK	DKGEVA	804
B. parapertussis	755	LVRAD	ITMPA	R	-RRS	VVISG	AGDR	REDELR	QOTE	ILGGAF	DDVI	LQDQC	QRGR	ADGEV	813
N. europaea	738	LVCA	IDHIPA	K	-KRT	VVISA	AGDR	RNEDIR	LQTR	ILGDVF	DEVV	LFQDKC	QRGR	ADGEVL	796
T. tengcongensis	745	VIEA	AARKLDA	N	-RLIG	VIGV	PGDR	MDSIF	KVGE	VCGGGF	DFIY	IKEDD	LRGR	KQGEVA	803
C. thermocellum	748	VMKF	LDKIDA	K	-RLVG	VIGM	PGDR	DDLSTY	KAGE	-----	-----	-----	-----	780	
A. variabilis	813	ALIT	KG-ITQ	VKPD	ARYESI	LDET	QAINKG	LDMA	PANGLV	VILP	ESVSRA	IKLI	KLGR	--	869
Acinetobacter	815	KIMR	DALIQ	GVPE	SRIHIV	EQED	SLAAV	LTEA	QVDDL	LFFC	ENITRS	WKQI	VHFTPE		874
D. hafniense	807	GMIME	EAIAS	GMDP	RRISVV	LPER	EAFCHG	LDTCK	PGEIF	VMFY	EHLEPI	EEET	ALR---		863
C. botulinum	803	DLLK	KGILET	GFKN	SKLNII	LDEE	EALKKA	IEFS	NPGLV	IMFF	EFEFPA	ENIV	KDK---		859
C. perfringens	805	SIINE	GVLS	NRKD	LVKII	LSEEE	ALRET	LKLA	KGETI	IMFF	EDYESL	YDI	INEF---		861
B. parapertussis	814	ALLR	QG-LQQ	APTR	HRHIDEI	QGEF	VAIDAA	LQRL	APGDL	LILV	DQVEEA	LAHT	IASR---		869
N. europaea	797	GLLR	EG-LEN	AKRV	KVSEI	RGEF	KAIDTA	LTNLE	EAGELC	LILID	QVEQA	LGVI	HSR---		852
T. tengcongensis	804	KILE	EGAIGK	GMDK	KNIKII	LKETE	ALKAA	MHSA	EAGDLI	VVFI	EKYEPL	VKV	IEEF---		860
C. thermocellum	780	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		780
A. variabilis	869	-----	LVKE	ETQQ	QNPSTT	VIDN	QNGVAS	SSVI	NTLL--	901					
Acinetobacter	875	FNIEN	DHETL	ELKIA	EQGFD	IPEG	YHAVSN	DRGV	MILPRG	914					
D. hafniense	863	-----	LESG	PLAKE	EEGFL	EVAN	LGAI--	-----	-----	885					
C. botulinum	859	-----	IKKG	KITK	RETALA	-----	-----	-----	-----	873					
C. perfringens	861	-----	KNKG	TKDL	KSASI-	-----	-----	-----	-----	874					
B. parapertussis	869	-----	-----	VAGQ	-----	-----	-----	-----	-----	874					
N. europaea	852	-----	-----	IAVA	-----	-----	-----	-----	-----	856					
T. tengcongensis	860	-----	VKNR	QIKN	MEDENK	VRAY	P-----	-----	-----	879					
C. thermocellum	780	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	780					

Sequenzvergleich wurde erzeugt mit:

BioEdit version 5.0, BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright© 1997-2001 Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University,

Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Die dunkelgrau hinterlegten Positionen bezeichnen Sequenzidentitäten, die hellgrau hinterlegten Flächen stehen für ähnliche Aminosäuren. Ähnlichkeitsdefinition BLOSUM62 wurde aus oben genanntem Programm übernommen.

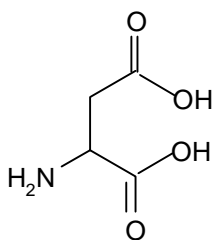
Originalquelle der Matrix: <ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/blocks/unix/blosum/BLOSUM/blosum62.bla>

Originalzitat: Henikoff, S. and Henikoff, J.G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89 (22), 10915-10919.

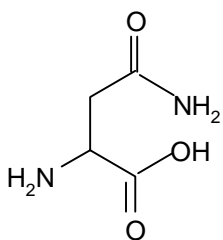
6.3.3. Legende zu Sequenzvergleichen

<i>A.variabilis</i>	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413
<i>Anabaena</i> 7120	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120
<i>N. punctiforme</i>	<i>Nostoc punctiforme</i>
<i>Synechococcus</i> MA19	<i>Synechococcus</i> sp. MA 19
<i>Trichodesmium</i> IMS101	<i>Trichodesmium erythreum</i> IMS 101
<i>Synechocystis</i> 6803	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>Cyanothece</i>	<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142
<i>Thermosyn. elong.</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1
<i>Synechocystis</i> 6308	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6308
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i> sp. ADP-1
<i>D.hafniense</i>	<i>Desulfobacterium hafniense</i> Stamm DCB-2
<i>C.botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C.perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>B.parapertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>N.europaea</i>	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 25978
<i>T.tengcongensis</i>	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>
<i>C.thermocellum</i>	<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405

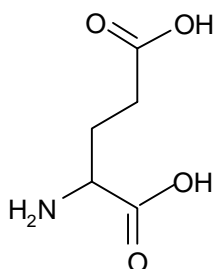
6.4. Verschiedene als Substrat untersuchte Verbindungen



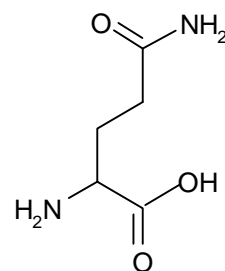
L-Aspartat



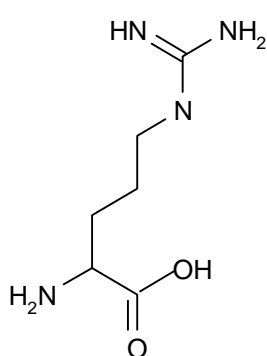
L-Asparagin



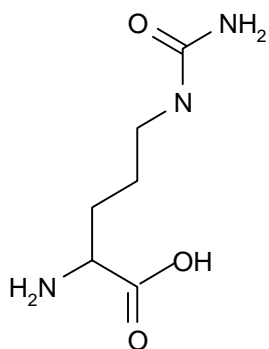
L-Glutamat



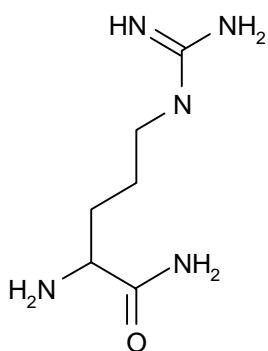
L-Glutamin



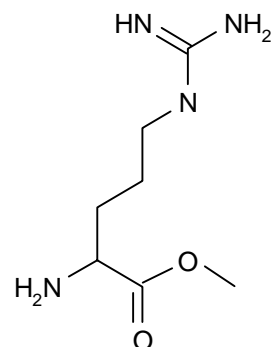
L-Arginin



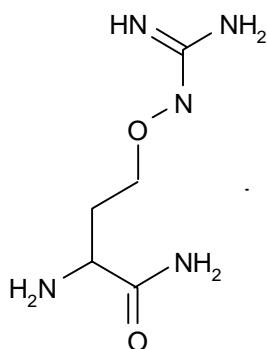
L-Citrullin



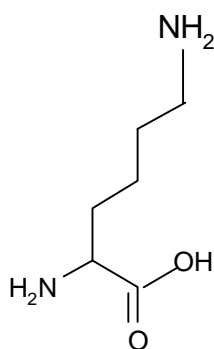
Argininamid



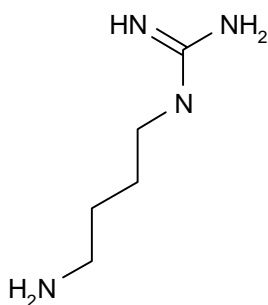
Argininmethylester



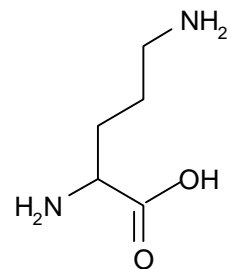
L-Canavanin



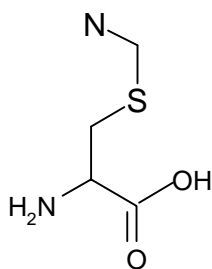
L-Lysin



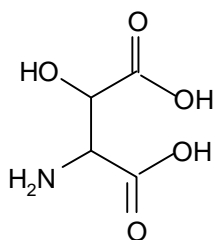
Agmatin



L-Ornithin



S-(2-Aminoethyl)Cystein



β-Hydroxy-Aspartat

6.5. Publikationen

Berg, H. (1998) Untersuchungen zur Verwendung von Peptidsynthetasen zur Herstellung von Peptidbibliotheken, Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

Ziegler, K., Berg, H., Volkmer-Engert, R., Lockau, W. (1999) Cyanophycin synthetase: investigations on structure and function, Poster bei: Fourth European Workshop on the molecular Biology of Cyanobacteria, Berlin.

Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Lockau, W., Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-arginyl-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers, Poster bei Botanikertagung 2000 in Jena.

Berg, H., Ziegler, K., Piotukh, K., Baier, K., Lockau, W., Volkmer-Engert, R. (2000) Biosynthesis of the cyanobacterial reserve polymer multi-L-poly-L-aspartic acid (cyanophycin): Mechanism of the cyanophycin synthetase reaction studied with synthetic primers, *European Journal of Biochemistry* 267, 5561-5570.

6.6. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Ich erkläre, dass ich mich bisher nicht an einer anderen Einrichtung um einen Doktorgrad beworben habe und keinen derartigen Titel besitze.

Berlin, den 10.04.2003

6.8. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises "Biochemie der Pflanzen". Der freundliche und offene Umgang untereinander und die allgemeine Hilfsbereitschaft waren ein Umstand, der einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat. Sehr geholfen haben mir im Labor Karl Ziegler, Mahdi Hejazi, Sabine Nicklisch, Jan Ebert und Kirill Piotukh. Ohne die fruchtbaren Diskussionen mit Dr. Karl Ziegler und Prof. Wolfgang Lockau wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen.